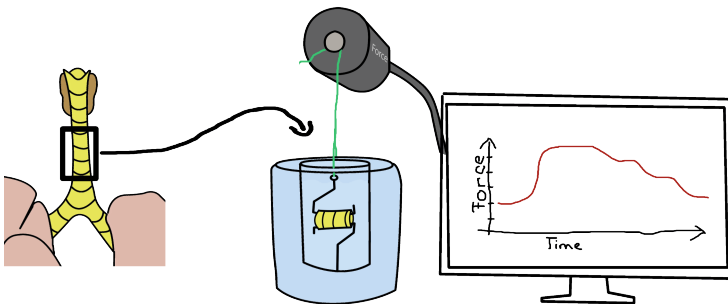


Effekte von TRPA1-Agonisten auf die Methacholin-induzierte Atemwegskonstriktion bei der Maus

GEORG HAIDER



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener
und
der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie
„Sektion Experimentelle Chirurgie“
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Prof. Dr. Veronika Grau

Effekte von TRPA1-Agonisten auf die
Methacholin-induzierte Atemwegskonstriktion
bei der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Georg Haider

Tierarzt aus Wels

Gießen, 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener
Prof. Dr. Veronika Grau
Prof. Dr. Kerstin Fey

Tag der Disputation: 24. Oktober 2016

für meine Familie

Nach § 10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Georg Haider

Inhaltsverzeichnis

1	Literaturübersicht	1
1.1	Obere und untere Atemwege	1
1.1.1	Die Trachea und der Bronchialbaum	1
1.1.2	Lunge	3
1.1.3	Innervation der unteren Atemwege	3
1.2	Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle	7
1.3	TRP-Kanäle in den Atemwegen	8
1.3.1	Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)	9
1.4	Ziel der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Versuchstiere	17
2.2	Retrogrades Markieren der sensorischen, atemwegs-innervierenden Neurone	18
2.3	Entnahme des Gewebes	19
2.3.1	Tötung der Tiere	19
2.3.2	Präparation des proximalen und distalen Ganglions des N. vagus sowie der Spinalganglien	19
2.3.3	Präparation der Trachea und des Thoraxpakets	20
2.4	Organbad	21
2.4.1	Wirkung des TRPA1-Agonisten CA auf murine Trachealstücke	22
2.4.2	Erstellung der Dosiskurven für TRPA1-Agonisten	23
2.4.3	Untersuchung der Bedeutung von TRPA1 bei der beobachteten Relaxion	23
2.4.4	Auswertung der Organbadversuche	25
2.5	Immunhistochemie	27
2.5.1	Probenaufarbeitung	29
2.5.2	Immunhistochemische Inkubation	29
2.6	Kalziumimaging	30
2.6.1	Dissoziation von Zellen	32
2.6.2	Kalziummessungen in den dissoziierten Neuronen	32
2.6.3	Auswertung der Kalziumimagingversuche	33
2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.7.1	cDNA-Synthese aus Einzelzellen mittels <i>cell picking</i>	37

2.7.2	Laser-Mikrodissektion	37
2.7.3	cDNA-Synthese aus ganzen Gewebestücken.....	38
2.7.4	Ansetzen des Mastermix und Durchführung der PCR.....	39
2.7.5	Gelelektrophorese.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Wirkung von TRPA1-Agonisten auf murine Trachealstücke	41
3.1.1	Wirkung des TRPA1-Agonisten CA auf murine Trachealstücke	41
3.1.2	Wirkung des TRPA1-Agonisten CA auf vorkontrahierte murine Trachealstücke	41
3.1.3	Repetitive Bronchokonstriktion mit MCH und Relaxation mit CA.....	43
3.1.4	Wirkung elektrophiler und nicht-elektrophiler TRPA1-Agonisten auf vorkontrahierte Trachealstücke.....	44
3.2	Rolle von TRPA1 bei der bronchodilatatorischen Wirkung von CA.....	49
3.2.1	Funktionskontrolle des TRPA1-Blockers HC-030031 mittels Kalziumimaging.....	49
3.2.2	Einfluss von TRPA1-Blockern auf die CA-vermittelte Bronchodilatation	50
3.2.3	Rolle der atemwegsinnervierenden C-Faser-Neurone bei der Wirkung des TRPA1-Agonisten CA	54
3.3	Untersuchung möglicher Signalwege für die CA-induzierte Bronchodilatation	60
3.3.1	Wirkung des COX-Inhibitors Indomethacin auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA	60
3.3.2	Wirkung des NK ₁ -Rezeptor-Antagonisten RP-67580 auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA	61
3.3.3	Wirkung des Kaliumkanal-Blocker Iberiotoxin auf die dilatatorische Wirkung von CA.....	63
3.3.4	Wirkung des NOS-Inhibitors L-NNA auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA.....	64
3.3.5	Wirkung des Natriumkanal-Blockers Tetrodotoxin auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA	66
3.3.6	Wirkung des β -Adrenorezeptorenblockers Propranolol auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA	67
3.3.7	Nachweis des TRPV3-Rezeptors in den Atemwegen und atemwegsinnervierenden Neuronen.....	69
4	Diskussion	75

4.1	Wirkung von CA auf isolierte Trachealstücke	75
4.2	Rolle von TRPA1 bei der beobachteten Wirkung von CA	77
4.2.1	Ätiologie der TRPA1-abhängigen Bronchokonstriktion.....	78
4.2.2	Untersuchung der Ätiologie der Bronchodilatation	80
4.3	Schlussfolgerung	84
5	Zusammenfassung	86
6	Summary	87
7	Abbildungsverzeichnis	88
8	Tabellenverzeichnis.....	90
9	Literaturverzeichnis.....	91
10	Veröffentlichungen.....	104
11	Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

2-APB.....	2-Aminoethyldiphenylborate
AITC.....	Allyl-Isothiocyanate
ASM.....	glatte Atemwegsmuskulatur
BK _{CA}	High conductance calciumsensitive potassium channel
CA.....	Zimtaldehyd
CGRP.....	Calcitonin gene-related peptide
COPD.....	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
FCS.....	fetales Kälberserum
Ggl.	Ganglion
Ggl.	Ganglia
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
JLU.....	Justus-Liebig-Universität
HBSS.....	Hanks' balanced salt solution
L-NNA.....	N ^G -Nitro-L-Arginin
MCH.....	Methacholin
MEM.....	Minimal essential medium
MW.....	Mittelwert
NK ₁	Neurokinin 1
NK ₂	Neurokinin 2
N.	Nervus
NO.....	Stickstoffmonoxid
NOS.....	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS.....	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PFA.....	Paraformaldehyd-Lösung
PG.....	Prostaglandin
PP.....	Phosphat-Puffer
RAR.....	Rapidly adapting receptor
ROS.....	reaktive Sauerstoffspezies
ROI.....	Region of interest

RT-PCR.....	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAR.....	Slowly adapting receptor
SD.....	Standardabweichung
SEM.....	Standard error of mean
SP.....	Substanz P
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
TEB.....	Trachealepithel-Brush
TRP.....	Transient Rezeptor Potential
TRPA1.....	Transient Rezeptor Potential Ankyrin 1
TRPV1.....	Transient Rezeptor Potential Vanilloid 1

1 Literaturübersicht

1.1 Obere und untere Atemwege

Durch den luftleitenden Anteil der Atemwege, zu dem die Nase, Nasenhöhlen, Pharynx, Larynx, Trachea, Bronchien und Bronchiolen zählen, wird die Luft zu dem gasaustauschenden Anteil der Atemwege, den Alveolen, befördert. Die luftleitenden Atemwege regulieren den Luftstrom zu dem gasaustauschenden Anteil der Atemwege, reinigen die Atemluft, unterstützen die Wasser- und Temperaturregulation und ermöglichen die Wahrnehmung olfaktorischer Reize sowie die Lautäußerung (EVANS & DE LAHUNTA, 2013). Neben der Unterteilung in luftleitende und gasaustauschende Anteile kann der Atmungsapparat auch nach topografischen Merkmalen in die oberen Atemwege (Nase, Nasenhöhle, Mundhöhle, Pharynx, Larynx) und die unteren Atemwege (Trachea, Bronchien, Lunge) unterteilt werden. Auf die unteren Atemwege soll nachfolgend genauer eingegangen werden.

1.1.1 Die Trachea und der Bronchialbaum

Die Trachea ist eine Röhre, die durch Knorpelspangen vor dem Kollabieren geschützt wird. Sie erstreckt sich zwischen dem Ringknorpel des Larynx bis zu ihrer Aufteilung in die beiden Hauptbronchi (Bifurcatio tracheae). Die Anzahl der Knorpelspangen variiert selbst innerhalb einer Spezies und beträgt beim Menschen 16-20. Bei den Haussäugetieren variiert die Anzahl der Knorpelspangen zwischen 29 und 60 (KÖNIG & LIEBICH, 2005) und bei der Maus und dem Hamster zwischen 15 und 18 (KENNEDY et al., 1978; SUAREZ et al., 2011). Der offene Bereich der C-förmigen Knorpelspangen, der dorsal liegt, wird von glatter Muskulatur (Musculus trachealis) und Bindegewebe überbrückt und somit der Ring geschlossen. Longitudinal sind die so geformten Trachealringe mit fibroelastischen Bändern (Ligamenta anularia trachealia) verbunden. Luminal ist die Trachea durchgehend mit einer mukoziliären Schleimhaut ausgekleidet und an ihrer Außenseite mit lockerem Bindegewebe (Adventitia) mit ihrer Umgebung verbunden. Die Schleimhaut sitzt der Lamina propria auf und beinhaltet zilierttragende und nicht-zilierttragende Epithelzellen, wobei der größte Anteil aller Epithelzellen zilierttragend ist. Die nicht-zilierttragenden Zellen können weiter in nicht-sekretorische und sekretorische Zellen unterteilt werden und sind bezogen auf ihre Anzahl, Struktur und dem sekretorischen Produkt sowohl im Trachealverlauf als auch tierartlich

unterschiedlich verteilt. So machen Becherzellen beim Menschen circa 9% der trachealen Epithelzellen aus, fehlen bei Mäusen aber gänzlich (PAVELKA et al., 1976). Im Gegensatz zum Menschen sind bei der Maus Clubzellen, welche Surfactant produzieren, in sehr großer Anzahl auch in der Trachea zu finden (PACK et al., 1980). Beim Menschen beschränken sich diese Zellen auf die distalen Atemwege, wie die Bronchioli terminales, die Bronchioli respiratorii und die Ductus alveolares. Neben diesen Epithelzellen gibt es noch weniger häufig vorkommende, spezialisierte Epithelzellen, wie die Bürstenzellen. Diese sind durch einen apikal gelegenen bürstenähnlichen Saum von Mikrovilli gekennzeichnet und dienen der Chemosensorik (KRASTEVA et al., 2011).

Am aboralen Ende der Trachea beginnt der Bronchialbaum mit dem linken und rechten Hauptbronchus (Bronchus principalis). Der Bronchialbaum lässt sich in ein luftleitendes Bronchialsystem, bestehend aus den Hauptbronchien, Lappenbronchien, Segmentbronchien, Subsegmentbronchien sowie den Bronchioli veri und Bronchioli terminales, und dem respiratorischen System, bestehend aus Bronchioli respiratorii, Ductus sowie Sacculi alveolares und Alveoli pulmonis, unterteilen, wobei sich das respiratorische System bei der Maus auf die Sacculi alveolares und Alveoli pulmonis beschränkt (HWANG et al., 2013).

Sämtliche Bronchien sind von einer respiratorischen Schleimhaut ausgekleidet, die in ihrer Wand glatte Muskulatur und hyalinen Knorpel in Form von Knorpelspangen bzw. Knorpelscheiben einschließen (KÖNIG & LIEBICH, 2005), wobei bei der Maus nur der linke Hauptbronchus von hyalinem Knorpel gestützt wird. Die Subsegmentalbronchien teilen sich weiter in Bronchioli, welchen sowohl knorpelige Stützelemente als auch Drüsen fehlen, während sowohl die Auskleidung mit respiratorischen Epithel als auch die subepithelialen glatten Muskelzellen erhalten bleiben (KÖNIG & LIEBICH, 2005). Die Bronchioli bilden nach ihrer Aufteilung die Bronchioli terminales, welche das Ende des luftleitenden Systems darstellen.

Das respiratorische System übernimmt die organspezifische Aufgabe der Lunge, den Gasaustausch, der nur in diesem Abschnitt der Atemwege möglich ist. Es beginnt mit den Bronchioli respiratorii, die sich bis zu zehn Mal teilen und so die Alveolargänge (Ductus alveolares) bilden. Die Wand der Alveolargänge ist dicht gedrängt von Alveolaren bzw. von Eingängen in Alveolargruppen (Sacculi alveolares). Die luminale Abdeckung durch ein respiratorisches Epithel nimmt im Verlauf der Aufzweigungen allmählich ab und wird letztlich durch ein Alveolarepithel abgelöst, um die Diffusionsstrecke beim Gasaustausch zu verkürzen (KÖNIG & LIEBICH, 2005).

1.1.2 Lunge

Die Lungen sind paarig ausgebildete Organe und füllen die beiden Pleurahüllen aus, die sie als Pleura viszeralis überziehen. Die Lappung der Lungen ist bei Säugern unterschiedlich. Die linke Lunge des Menschen sowie die der Haussäugetiere weist in der Regel zwei Lappen auf, einen oberen (Lobus superior seu cranialis) und einen unteren (Lobus inferior seu caudalis). Bei den Haussäugetieren ist der Lobus cranialis meist in eine Pars cranialis und eine Pars caudalis unterteilt (KÖNIG & LIEBICH, 2005). Im Gegensatz dazu fehlt der Maus eine Lappung der linken Lunge (SUAREZ et al., 2011).

Die rechte Lunge ist bei vielen Haussäugetieren, wie auch beim Menschen, in drei Lappen, einen Oberlappen (Lobus superior seu cranialis), einen Mittellappen (Lobus medius) und einen Unterlappen (Lobus inferior seu caudalis) untergliedert. Bei den Haussäugetieren sowie bei der Maus ist ein zusätzlicher Lappen (Lobus accessorius), der in der rechten Pleurahöhle unter dem Herzen liegt und zu einem großen Teil auf die linke Seite des Brustkorbs ragt, vorhanden (KÖNIG & LIEBICH, 2005; SUAREZ et al., 2011).

1.1.3 Innervation der unteren Atemwege

Die Innervation der unteren Atemwege entstammt hauptsächlich dem Nervus (N) vagus, den Spinalnerven und dem Truncus sympathicus und kann in eine parasympathische, sympathische und sensorische Komponente unterteilt werden. Die Hauptbronchien und die distal gelegenen Abschnitte des Bronchialbaums werden vom Plexus pulmonalis innerviert, der sich beidseitig auf der Ventral- und Dorsalseite der Hauptbronchien befindet und von Ästen des N. vagus und des Truncus sympathicus gebildet wird. Die Zellkörper der präganglionären parasympathischen Neurone befinden sich im Nucleus ambiguus sowie im Nucleus dorsalis n. vagi im Hirnstamm und entsenden ihre Axone mit dem N. vagus zum Plexus pulmonalis (KALIA & MESULAM, 1980). Die parasympathischen Neurone werden organnah auf kurze postganglionäre Nervenfasern umgeschaltet. Der sympathische Anteil der Innervation nimmt seinen Ursprung im Seitenhorn des Zervikal- und Thorakalmarks. Diese werden in den Ganglien des Truncus sympathicus umgeschaltet, welcher strickleiterartig die Wirbelsäule auf der Ventralseite begleitet, spielen jedoch bei der Innervation der Lunge eine untergeordnete Rolle. Die sensorischen Neurone der Atemwege verlaufen mit dem N. vagus und den Spinalnerven, wobei die genaue Funktion des spinal verlaufenden Anteils an der sensorischen (afferenten) Innervation der Atemwege bislang wenig erforscht ist. Im Gegensatz dazu sind die Aufgaben der vagalen afferenten Neurone bei der Innervation der Lunge gut beschrieben und sollen nachfolgend genauer betrachtet werden.

1.1.3.1 Afferente Neurone des N. vagus

Die Perikarien der vagalen afferenten Neurone des bronchopulmonalen Systems befinden sich in den bilateral ausgebildeten, inferioren (Ggll. nodosa) und superioren (Ggll. jugulare) Ganglien des N. vagus. Das Ggl. nodosum und das Ggl. jugulare besitzen eine unterschiedliche embryonale Abstammung und sind bei der Ratte getrennt (ZHUO et al., 1997), beim Meerschweinchen einander nahe aber deutlich getrennt und bei der Maus gemeinsam als Ganglienkomplex ausgebildet (NASSENSTEIN et al., 2010). Zellen des Ggl. nodosum entstammen den epibranchialen Plakoden und die Zellen des Ggl. jugulare der Neuralleiste (D'AMICO-MARTEL & NODEN, 1983; BAKER & BRONNER-FRASER, 2001). Die zentralen Axone der pseudounipolaren afferenten vagalen Neurone treten mit efferenten Nervenfasern als N. vagus durch das Foramen jugulare in die Schädelhöhle ein und enden im Nucleus tractus solitarii der Medulla oblongata (KALIA & MESULAM, 1980; PUIZILLOUT & GAMBARELLI, 1989; ZHUO et al., 1997). Die peripheren Enden der Axone dieser Neurone ziehen parallel zu den efferenten Nervenfasern des N. vagus zur Lunge. Neben ihren anatomischen, embryologischen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden sich die Neurone dieser beiden Ganglien auch in ihrer Empfindlichkeit gegenüber chemischen und mechanischen Reizen (HO et al., 2001; WIDDICOMBE, 2001). Hinsichtlich dieser Unterschiede sind in der Literatur mehrere Schemata der Klassifikation beschrieben, die auf Unterschiede in der Leitungsgeschwindigkeit oder Größe der Neurone, der embryonalen Herkunft der Zellkörper, der Art der Stimuli, die zu einer Erregung führen, der Geschwindigkeit mit der sich die Neurone an wiederholte Stimuli adaptieren oder auf ihren neurochemischen Eigenschaften basierend, wobei es kein Schema gibt, das alle diese Aspekte in Betracht zieht (CARR & UNDEM, 2003). Eine weit verbreitete Einteilung erfolgt nach anatomisch-physiologischen Kriterien in A-Faser- und C-Faser-Neurone.

Hustenrezeptoren

John Widdicombe beschrieb einen Subtyp von myelinisierten, afferenten vagalen Nervenfasern, welche die Trachea, die Hauptbronchi sowie die Segmentalbronchi innervieren und eine wichtige Rolle beim Hustenreflex spielen (WIDDICOMBE, 1954). Die peripheren Endigungen dieser sogenannten Hustenrezeptoren sind in großer Anzahl in der Mukosa der Atemwege zwischen der glatten Muskulatur und dem Epithel zu finden (MAZZONE et al., 2009).

Hustenrezeptoren können von Dehnungsrezeptoren und C-Faser-Neuronen anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeit (5 m/s) unterschieden werden, welche schneller als jene der C-Faser-Neurone (< 1 m/s), jedoch geringer als jene der Dehnungsrezeptoren (≥ 15 m/s) ist. Im

Gegensatz zu C-Faser-Neuronen besitzen Hustenrezeptoren eine Myelinscheide, sie reagieren aber, wie Dehnungsrezeptoren, nicht auf chemische Substanzen, wie zum Beispiel Capsaicin (UNDEM & TAYLOR-CLARK, 2014). Wie die schnell adaptierenden Dehnungsrezeptoren (rapidly adapting receptors; RAR) können sich Hustenrezeptoren sehr schnell auf mechanische Reize einstellen. Im Gegensatz zu RAR sind Hustenrezeptoren aber ausschließlich in den extrapulmonalen Atemwegen (Larynx, Trachea, Hauptbronchus) zu finden und sind äußerst unsensibel auf Substanzen, die eine Kontraktion der glatten Muskulatur bewirken, wie MCH, Histamin, Substanz P (SP), Neurokinin A, Serotonin (5-HT) und Adenosintriphosphat (ATP). All diese Substanzen aktivieren jedoch RAR, lösen aber keinen Hustenreiz aus (JOOS et al., 1987; FUJIMURA et al., 1992; UNDEM & TAYLOR-CLARK, 2014). Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften können Hustenrezeptoren von RAR und C-Faser-Neurone abgegrenzt werden.

A-Faser-Neurone

A-Faser-Neurone sind pulmonale Dehnungsrezeptoren und werden anhand ihrer Reaktion auf anhaltende Lungenfüllung eingeteilt. Beide, RAR und langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren (slowly adapting receptors; SAR), werden durch die Dehnung der Lunge aktiviert, wobei die RAR primär während der dynamischen Phase der Inflation der Lunge aktiv sind, während bei SAR bei anhaltender Dehnung der Lunge Aktionspotentiale ausgelöst werden (PACK & DELANEY, 1983; JONZON et al., 1985; YU, 2000; HO et al., 2001; SCHELEGLE & GREEN, 2001; WIDDICOMBE, 2003). Wie aus der Bezeichnung der beiden Dehnungsrezeptoren hervorgeht, erfolgt eine Unterscheidung anhand ihrer Adaptionsrate auf Reize. Jedoch überlappen die Adaptionsraten von einigen RAR mit jenen einiger SAR (WIDDICOMBE, 1954), was eine Unterscheidung vor allem im Übergang von SAR zu RAR schwierig macht (WIDDICOMBE, 2003). Eine andere Unterscheidung gelingt durch die Faserqualität der unterschiedlichen Rezeptoren. Die Fasern der RAR sind myelinisiert und gehören zu den A δ -Fasern, welche einen Durchmesser von 1-3 μ m und eine Leitungsgeschwindigkeit von 12-30 m/s besitzen. Ebenso wie die Fasern der RAR sind auch die Fasern der SAR myelinisiert, jedoch gehören diese hauptsächlich den A β - und A γ -Fasern an, deren Leitungsgeschwindigkeit und Durchmesser größer sind (WIDDICOMBE, 2003). Aufgrund der überlappenden Eigenschaften von A β -Fasern und A δ -Fasern ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen SAR und RAR anhand der Faserqualität aber nicht immer möglich. Auch die Lage der Zellkörper unterscheidet sich zwischen beiden Arten von Dehnungsrezeptoren. So liegen die meisten Zellkörper der RAR im Ggl. nodosum,

wohingegen das Ggl. jugulare hauptsächlich Perikarien der A δ -Fasern beherbergt (RICCIO et al., 1996; CARR & UNDEM, 2003).

Die Anatomie der Termini der RAR-Fasern in den Atemwegen ist unklar. Funktionelle Studien der RAR lassen jedoch auf eine intrapulmonale Lage im oder unter dem Epithel schließen (WIDDICOMBE, 1954; WIDDICOMBE, 2003). Diese Lage würde die Sensitivität auf eine Entleerung der Lunge bzw. deren Kollaps erklären, wobei die Reaktion auf Änderungen in der dynamischen Compliance der Lunge auf eine Verbindung mit der glatten Muskulatur der Atemwege schließen lässt (UNDEM & TAYLOR-CLARK, 2014). HUNTER und UNDEM (1999) konnten beim Meerschweinchen durch anterograde Färbung der Neurone die Lage der RAR-Termini unter dem Epithel bestätigen. Die Faserendigungen der SAR hingegen liegen in der glatten Muskulatur der Atemwege (WIDDICOMBE, 1954), was ihre Empfindlichkeit auf die Steigerung der Dehnung der Atemwege erklärt. Die erste dokumentierte Beschreibung der Funktion der SAR als afferenter „Input“ im Hering-Breuer-Reflex stammt aus dem Jahre 1868. Dieser Reflex beendet die Inspiration und leitet die Expiration ein, sobald die Lungen adäquat mit Luft gefüllt sind (SCHELEGLE & GREEN, 2001). Die Summation der Impulse der SAR im Hirnstamm während der Inspiration gilt heute als eine Art „Off-Switch“ um die Inspiration zu beenden (SCHELEGLE & GREEN, 2001).

C-Faser-Neurone

Im Gegensatz zu den Husten- und Dehnungsrezeptoren der Lunge sind C-Faser-Neurone nicht myelinisiert und nehmen den größten Anteil der bronchopulmonalen afferenten vagalen Neurone ein (AGOSTONI et al., 1957; LEE & PISARRI, 2001; UNDEM et al., 2004; NASSENSTEIN et al., 2010). Ihre Zellkörper befinden sich im Ggl. jugulare und dem Ggl. nodosum. Da diese beiden Ganglien, wie einleitend beschrieben, unterschiedlicher embryonaler Herkunft sind, ist es wenig verwunderlich, dass unterschiedliche Subtypen von bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen beschrieben werden können (UNDEM et al., 2004; NASSENSTEIN et al., 2010). Pulmonale C-Faser-Neurone entstammen hauptsächlich dem Ggl. nodosum. Im Unterschied dazu versorgen C-Faser-Neurone des Ggl. jugulare hauptsächlich die Trachea und die Hauptbronchi und nur wenige C-Fasern aus diesem Ggl. ziehen in die Lunge (UNDEM et al., 2004). Die Neurone der beiden Ganglien unterscheiden sich nicht nur in ihrem Innervationsgebiet, sondern auch in ihren Neuropeptiden (UNDEM et al., 2004). So enthalten C-Faser-Neurone, deren Zellkerne im Ggl. jugulare liegen, SP und das Neuropeptid Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), nicht jedoch Neurone des Ggl. nodosum (SPRINGALL et al., 1987; KUMMER et al., 1992). Im Gegensatz dazu reagieren pulmonale Neurone, deren Zellkörper im Ggl. nodosum liegen, sensibel auf die Stimulation

mit dem P2X_{2/3}-Rezeptor Agonisten α,β -Methylen-ATP (UNDEM et al., 2004), nicht jedoch jene, die dem Ggl. jugulare entstammen.

C-Faser-Neurone beider Ganglien reagieren jedoch auf toxische Stimuli, wie z.B. Capsaicin, einem Agonisten des Transient Receptor Potential Kanal Vanilloid 1 (TRPV1). Die Expression dieses Ionenkanals ist ein Merkmal der bronchopulmonalen Nozizeptoren, wobei neben der lang bekannten Expression von TRPV1 (COLERIDGE & COLERIDGE, 1977; FULLER et al., 1985; KOLLARIK et al., 2003) auch die Expression eines weiteren Ionenkanals dieser Familie (TRPA1, Ankyrin) in beinahe allen lungeninnervierenden Neuronen gezeigt wurde (NASSENSTEIN et al., 2008). Dieser Rezeptor wird durch Umweltirritantien, wie z.B. Acrolein (BAUTISTA et al., 2006) und Ozon, aktiviert, welche durch TRPV1 nicht wahrgenommen werden.

Anhand der TRPV1- und SP-Expression konnten periphere Endigungen der afferenten C-Faser-Neurone im Epithel der Atemwege bei Meerschweinchen und Ratten nachgewiesen werden (BALUK et al., 1992; RICCIO et al., 1996; HUNTER & UNDEM, 1999; MAZZONE et al., 2009), wohingegen der Nachweis des TRPA1-Rezeptors an den peripheren Termini der C-Faser-Neurone bislang nur durch funktionelle Versuche erfolgt ist (NASSENSTEIN et al., 2008).

Aufgrund der epithelialen Lage sowie der Möglichkeit, verschiedene toxische Reize wahrzunehmen, wird angenommen, dass C-Faser-Neurone klassische Schutzreflexe der Atemwege auslösen können. Diese Reflexe beinhalten Apnoe, Bradykardie, systemische Hypotension, Bronchokonstriktion und möglicher Weise auch Husten und Niesen (UNDEM et al., 2004). Wegen der zentralen Rolle der beiden TRP-Kanäle in der Wahrnehmung von schädlichen Substanzen sollen diese im nachfolgenden Kapitel genauer betrachtet werden.

1.2 Transient Rezeptor Potential (TRP) Kanäle

TRP-Kanäle wurden erstmalig im Auge der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) beschrieben und nach ihrer „transienten“ Reaktion auf helles Licht benannt (MONTPELL & RUBIN, 1989). Seit dieser Entdeckung wurden insgesamt 28 Mitglieder der Superfamilie der TRP-Kanäle entdeckt, welche aufgrund ihrer Sequenzhomologien in sechs Subfamilien eingeteilt werden können (CLAPHAM, 2003): TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin) und TRPA (Ankyrin). TRP-Kanäle sind unspezifische Kation-selektive Ionenkanäle, besitzen jedoch eine Präferenz für Kalziumionen.

Die bekannten Funktionen von TRP-Kanälen sind sehr unterschiedlich (CLAPHAM, 2003). Hefe-Pilze nutzen diese Rezeptoren zum Beispiel zur Druckwahrnehmung (ZHOU et al., 2003), Nematoden verwenden TRP-Kanäle, um schädliche Chemikalien zu erkennen (BONO et al., 2002), und männliche Mäuse nutzen Pheromon-sensible TRP-Kanäle, um weibliche von männlichen Tieren zu unterscheiden (STOWERS et al., 2002). Beim Menschen umfassen die beschriebenen Funktionen von TRP-Kanälen unter anderem die Signaltransduktion nach der Stimulation von G-Protein-gekoppelten Süß-, Bitter- und Umamirezeptoren (ZHANG et al., 2003) und das Wahrnehmen von Temperaturen. In all diesen Fällen dienen TRP-Kanäle der sensorischen Wahrnehmung, nicht nur bei Metabiota, sondern auch bei Einzellern (CLAPHAM, 2003).

TRP-Kanäle bestehen aus sechs transmembranen Domänen und intrazellulären C- und N-Termini. Sie besitzen eine Kanalpore, welche zwischen der fünften und sechsten Domäne liegt, und eine variable Anzahl von Ankyrin-Wiederholungen am N-Terminus (LIAO et al., 2013). Sie sind im menschlichen Körper weitverbreitet exprimiert (GRACE et al., 2014) und können auf eine Vielzahl von unterschiedlichen intra- und extrazellulären Reizen reagieren. Aus diesem Grund sind TRP-Kanäle in den letzten Jahren nicht nur hinsichtlich von Atemwegserkrankungen immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus gerückt.

1.3 TRP-Kanäle in den Atemwegen

Die Atemwege sind durch ihre physiologische Funktion potenziell schädlichen Substanzen in der Atemluft ausgesetzt. Reflexe, wie Niesen oder Husten, sind deshalb zum Schutz der Atemwege unerlässlich (COLERIDGE & COLERIDGE, 1994). Diese Reflexe werden durch die Aktivierung von sensorischen Neuronen in den Atemwegen getriggert. Chemosensorische Neurone des N. trigeminus mit Endigungen in der Mukosa der Nasenschleimhaut nehmen mögliche Schadstoffe in der Atemluft als Erste wahr und können neben Niesen auch eine erhöhte Sekretproduktion der Tränen- und Speicheldrüsen einleiten. Sensorische Neurone des N. vagus mit Endigungen in der Glottis triggern Husten und unterstützen so den Ausstoß von schädlichen Partikeln oder Schleim. Wenn Schadstoffe die unteren Atemwege erreichen, kann eine Aktivierung der sensorischen vagalen Afferenzen zur Bronchokonstriktion, erhöhter Mukussekretion oder einer neurogener Entzündung führen (COLERIDGE & COLERIDGE, 1994). TRP-Kanäle spielen bei der Wahrnehmung von schädlichen Substanzen in der Atemluft, wie sie in Abgasen oder Zigarettenrauch vorkommen, eine entscheidende Rolle.

In den Atemwegen wurden bislang fünf TRP-Kanäle nachgewiesen, nämlich TRPA1, TRPV1, TRPV4, TRPM5 und TRPM8 (ALVAREZ et al., 2006; WATANABE et al., 2006;

KASKE et al., 2007; NASSENSTEIN et al., 2008). Vor allem TRPV1 und TRPA1, welche von den afferenten sensorischen Neuronen exprimiert werden (NASSENSTEIN et al., 2008), können durch eine selektive Aktivierung durch ihre Agonisten eine Bronchokonstriktion oder Husten auslösen (FORSBERG & KARLSSON, 1986; BIRRELL et al., 2009).

1.3.1 Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)

TRPA1-Kanäle wurden erstmalig aus kultivierten, humanen Fibroblasten isoliert (JAQUEMAR et al., 1999). Sie wurden ursprünglich aufgrund ihrer großen Anzahl an N-terminalen Ankyrin-Wiederholungen als Ankyrin-like Transmembrane Protein (ANKTM1) bezeichnet und sind bislang das einzig bekannte Mitglied der Ankyrin-Subfamilie.

Nachdem TRPA1 ursprünglich als Ionenkanal, der auf Kälte ($< 17^{\circ}$) reagiert, beschrieben wurde (STORY et al., 2003), ist mittlerweile eine große Anzahl von reizenden oder scharfen Substanzen wie Zimtaldehyd (CA), Allyl-Isouthiocyanate (AITC), Acrolein, Allicin, Formalin, Ozon und Chlor bekannt, die diesen Kanal aktivieren können (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; MACPHERSON et al., 2007). Alle diese Substanzen sind in der Lage, akuten Schmerz, Hyperalgesie oder eine neurogene Entzündung sowohl bei Tieren als auch beim Menschen hervorzurufen (BAUTISTA et al., 2006; MCNAMARA et al., 2007).

1.3.1.1 Expression von TRPA1

TRPA1 ist hauptsächlich in Neuronen der Spinalganglien, des N. trigeminus, sowie des N. vagus exprimiert (STORY et al., 2003; BANDELL et al., 2004; NASSENSTEIN et al., 2008). In den afferenten C-Faser-Neuronen des N. vagus ist TRPA1 meist gemeinsam mit dem zweiten neuronal dominierenden TRP-Kanal (TRPV1) ausgebildet (NASSENSTEIN et al., 2008). Neben der Expression in neuronalen Strukturen wird TRPA1 auch in einigen nicht-neuronalen Zellen exprimiert, wie zum Beispiel im Endothel von Gefäßen, im endokrinen Pankreas, aber auch der in der Lunge (STOKES et al., 2006).

In isolierten zerebralen Arterien löst AITC eine konzentrationsabhängige Vasodilatation aus, welche durch TRPA1-Antagonisten geblockt werden kann. Diese Vasodilatation wird durch endotheliale TRPA1-Kanäle vermittelt (EARLEY, 2009). In enterochromaffinen Zellen des Verdauungstrakts sowie in einer humanen Zelllinie des endokrinen Pankreas (QGP-1 Zellen) kann ebenfalls die Expression von TRPA1-Kanälen gezeigt werden, durch deren Aktivierung Serotonin freigesetzt wird (DOIHARA et al., 2009; NOZAWA et al., 2009). Im isolierten Ileum führt die TRPA1-medierte Ausschüttung von Serotonin zu einer Kontraktion (NOZAWA et al., 2009). Diese Ergebnisse lassen einen regulatorischen Effekt von TRPA1

im Gastrointestinaltrakt vermuten (DOIHARA et al., 2009; NOZAWA et al., 2009). Neben der Expression von TRPA1-Kanälen in neuronalen Strukturen der Haut wurden diese auch in Keratinozyten nachgewiesen (KWAN et al., 2009), wobei deren genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (BARALDI et al., 2010). Mittels immunhistologischer Untersuchung wurden TRPA1-Kanäle nicht nur in den nicht-myelinisierten, sensorischen Neuronen der Harnblase, sondern auch im Urothel, suburothelialen Raum, der Muskelschicht und den umgebenden Blutgefäßen gezeigt (STRENG et al., 2008). Erste Studien lassen vermuten, dass eine Aktivierung der TRPA1-Kanäle unter anderem auch die Miktion auslösen kann (STRENG et al., 2008).

1.3.1.2 Aktivierung von TRPA1

TRPA1 kann durch viele unterschiedliche Stoffe aktiviert werden. Erstaunlich dabei ist, dass TRPA1 einerseits auf sehr unterschiedliche chemische Stoffe reagiert, auf der anderen Seite aber fähig ist, verschiedene Stoffe erstaunlich exakt zu unterscheiden (PETERLIN et al., 2007). Zum Beispiel ist Acrolein ein bekannter TRPA1-Agonist, sein korrespondierendes, gesättigtes Aldehyd Propanal vermag TRPA1 jedoch nicht zu aktivieren (Abbildung 1.1; BAUTISTA et al., 2006). Die Erklärung dafür ist, dass bei der Aktivierung des TRPA1-Kanals die chemische Reaktionsfreudigkeit eines Agonisten

Propanal



Acrolein

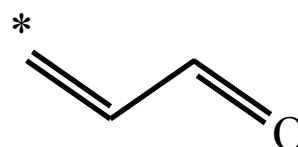


Abbildung 1.1: Struktureller Vergleich von Acrolein und Propanal (*= elektrophiles Atom)

wichtiger ist als seine chemische Struktur (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007) und Acrolein im Gegensatz zu Propanal ein reaktives Elektron besitzt. Alle TRPA1-Agonisten, die den Ionenkanal auf diese Weise aktivieren, besitzen ein elektrophiles Kohlenstoff- oder Schwefelmolekül (PETERLIN et al., 2007), das eine kovalente Bindung mit den Cysteinresten der intrazellulär gelegenen N-terminalen Domäne des TRPA1-Rezeptors ermöglicht (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007; MCNAMARA et al., 2007). Als Konsequenz daraus ist die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) eines Stoffes, der den Ionenkanal auf diese Weise aktiviert, einerseits von der Ausprägung der elektrophilen Eigenschaft und andererseits von der Permeabilität der Zellmembran für diesen Stoff abhängig (PETERLIN et al., 2007). Zusätzlich ändert sich durch die kovalente Bindung eines elektrophilen Agonisten die Struktur des TRPA1-Rezeptors, wobei diese Änderung für Stunden anhalten kann (MACPHERSON et al., 2007). Das bedeutet, dass die physiologische

Antwort des Rezeptors auf elektrophile Stoffe verlängert ist, da der Agonist an der Bindungsstelle gebunden bleibt und der Kanal damit weiter geöffnet bleibt. Damit ist die TRPA1-Antwort bei einer wiederholten Stimulation durch einen elektrophilen Agonisten eingeschränkt (MACPHERSON et al., 2007; PETERLIN et al., 2007).

TRPA1-Rezeptormutationen, welchen eine Bindung von elektrophilen Agonisten nicht mehr möglich ist, konnten jedoch weiterhin durch nicht-elektrophile Agonisten aktiviert werden (MACPHERSON et al., 2007). Die dabei gemessene Ströme sind sehr schnell reversibel, was auf eine transiente Aktivierung des Rezeptors nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip hindeutet (JORDT et al., 2004; XU et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007). Diese Art der Aktivierung gleicht der chemischen Aktivierung anderer TRP-Kanäle, wie zum Beispiel der Aktivierung von TRPV1-Kanälen durch Capsaicin, und stellt einen zweiten, von der Aktivierung durch elektrophile Stoffe unabhängigen Weg der Aktivierung dar.

Neben der Aktivierung durch chemische Substanzen sind in der Literatur die thermische sowie die mechanische Aktivierung des Rezeptors beschrieben worden. Die Funktion von TRPA1 in der Wahrnehmung von Kälte wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ursprünglich als kältesensibler Kanal beschrieben, der bei etwa 17°C aktiviert wird (STORY et al., 2003; KWAN et al., 2006; SAWADA et al., 2008), konnten andere Autoren keine Aktivierung von TRPA1 durch Kälte beobachten (JORDT et al., 2004; NAGATA et al., 2005). In neueren Studien wurde die Beteiligung von TRPA1 an der Temperaturwahrnehmung bewiesen, indem gezeigt wurde, dass TRPA1-Knockout-Mäusen eine verminderte Reaktion auf Kälte zeigen (KARASHIMA et al., 2009). Auch die mechanische Aktivierung von TRPA1 wird sehr kontrovers diskutiert. Eine mechanische Aktivierung des TRPA1-Kanals wurde sowohl bei Würmern als auch bei Mäusen beschrieben (KWAN et al., 2006; KINDT et al., 2007; KWAN et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte dieses Ergebnis in einer anderen Studie mit TRPA1-Knockout Mäusen nicht bestätigt werden (BAUTISTA et al., 2006). Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse kann eine essentielle Beteiligung von TRPA1 an der Mechanosensorik nicht angenommen werden, jedoch scheinen TRPA1-Rezeptoren die mechanosensorische Wahrnehmung zu modulieren (BARALDI et al., 2010).

Im Gegensatz zu der kontrovers diskutierten mechanischen und thermischen Aktivierung von TRPA1 ist die Aktivierung durch chemische, potentiell schädliche Substanzen des Ionenkanals unumstritten. Wie unter Punkt 1.3.1.2 beschrieben, kann TRPA1 durch eine kovalente Bindung eine Vielzahl an chemischen Substanzen aktiviert werden, was ihn zum Sensor für diverse, chemisch unterschiedliche Umweltschadstoffe macht (BARALDI et al.,

2010). Eine Übersicht der unterschiedlichen chemischen Agonisten soll nachfolgend gegeben werden.

1.3.1.3 Agonisten von TRPA1

TRPA1 ist in der Lage, auf eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Substanzen zu reagieren. Neben exogenen Substanzen, hauptsächlich Schadstoffen aus der Umwelt, Stoffen aus Pflanzen, die diesen zur Abwehr dienen, aber auch Arzneimitteln, kann TRPA1 auch auf endogene Substanzen reagieren, welche zum Beispiel bei Entzündungen ausgeschüttet werden. Die nachfolgende Beschreibung gibt dabei nur eine Übersicht der wichtigsten, bislang beschriebenen TRPA1-Agonisten, da durch die spezielle Art der Rezeptoraktivierung laufend neue Agonisten beschrieben werden.

Phytochemische TRPA1-Agonisten

Viele TRPA1-Agonisten sind Stoffe, die von den Pflanzen als Abwehrstoffe gegen Fressfeinde gebildet werden. Pflanzen der Gattung *Sinapis* (Senf), *Allium* (Zwiebel) und *Cinnamomum* (Zimt), allesamt aus der Kulinarik bekannt, bilden Isocyanate, Thiosulfinate und α,β -ungesättigte Aldehyde, welche in der Lage sind, TRPA1 zu aktivieren.

Allium sativum, allgemein als Knoblauch bekannt, gehört wie auch Zwiebel, Lauch und Schnittlauch zur Gattung *Allium*. Diese Pflanzen sind in der Lage, Allicin aus der schwefelhaltigen Aminosäure Alliin durch die Alliinase zu bilden, sobald ihre Zellstruktur zerstört wird. Allicin ist ein Agonist von TRPA1 als auch TRPV1 (MACPHERSON et al., 2005). Wie andere reaktive Thiosulfinate auch, ist Allicin nicht sehr stabil und wandelt sich spontan in Di- und Trisulfide um, wobei die so entstandenen Stoffe Diallylsulfid, Diallyldisulfid und Diallyltrisulfid, im Gegensatz zum geruchlosen Allicin, für das knoblauchtypische Aroma und dessen Geruch verantwortlich sind (MACPHERSON et al., 2005). Auch diese Stoffe sind in der Lage, den TRPA1-Rezeptor zu aktivieren.

Da sich Organoschwefelverbindungen einige strukturelle Eigenschaften teilen, ist es wenig verwunderlich, dass noch weitere Verbindungen dieser Gruppe als TRPA1-Agonisten agieren. AITC, ein Inhaltsstoff von Wasabi (*Eutrema japonicum*), Meerrettich (*Armoracia rusticana*) und Senföl, ist wie andere Isothiocyanate in der Lage, TRPA1 zu öffnen (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007). Neben TRPA1 kann AITC noch andere TRP-Kanäle, wie z.B. TRPV1, aktivieren (OHTA et al., 2007). Wie bei anderen TRPA1-Agonisten erfolgt die Aktivierung des Ionenkanals bei diesen Stoffen durch eine kovalente Bindung am intrazellulären N-Terminus des Rezeptors.

Thymol, ein Monoterpen, ist neben seinem Isomer Carvacrol ein Bestandteil der ätherischen Öle von Thymian (*Thymus vulgaris*) und Oregano (*Origanum vulgare*) und ein Agonist sowohl von TRPA1 als auch von TRPV3 und TRPM8. Der exakte Mechanismus, wodurch Thymol TRPA1 aktiviert, ist noch unklar, jedoch ist wahrscheinlich, dass Thymol und Carvacrol aufgrund ihrer nicht-elektrophilen Eigenschaft nicht wie CA über den kovalenten Mechanismus agieren (LEE et al., 2008). Eugenol, welches in der Gewürznelke enthalten ist, und Gingerol aus der Ingwerwurzel sind weitere Beispiele von Alkylphenolen und zählen ebenfalls zu den TRPA1-Agonisten (BANDELL et al., 2004).

Nikotin, ein Alkaloid aus der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*), ist ein weiterer nicht-elektrophiler pflanzlicher TRPA1-Agonist und besitzt etwa die gleiche mittlere effektive Konzentration (EC_{50} : 20 μ M) wie AITC (TALAVERA et al., 2009). Aufgrund der nicht-elektrophilen Eigenschaft von Nikotin ist auch hier eine Aktivierung durch eine kovalente Bindung unwahrscheinlich (BARALDI et al., 2010).

Umweltirritantien

TRPA1 ist ein bekannter Sensor für Umweltirritantien in der Atemluft, wie Formaldehyd (MCNAMARA et al., 2007) oder ungesättigte Aldehyde (BAUTISTA et al., 2006). Acrolein, ein Bestandteil des Zigarettenrauchs, entsteht bei der Überhitzung oder Verbrennung von pflanzlichen und tierischen Stoffen und gehört, wie die Isothiocyanate und Thiosulfinate, zu den reaktiven α,β -ungesättigten Aldehyden (BAUTISTA et al., 2006). Ein weiteres α,β -ungesättigtes Aldehyd ist Crotonaldehyd, das ebenfalls im Zigarettenrauch vorkommt, aber auch endogen durch oxidativen Stress gebildet wird und ebenfalls ein TRPA1-Agonist ist (ANDRÈ et al., 2008).

Endogene Agonisten

Das allergische Asthma und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sind Beispiele für chronische Erkrankungen, die durch oxidativen Stress charakterisiert sind. Beim oxidativen Stress entstehen über das physiologische Ausmaß hinaus reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS = reactive oxygen species), die zu einer Zellschädigung führen. Durch den ROS-medierten, oxidativen Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen kommt es zu einem Überschuss an Abbauprodukten, zu denen auch α,β -ungesättigte Aldehyde gehören. Diese konnten in den Atemwegen, der Atemluft, den Lungen und dem Blut von Asthma- und COPD-Patienten nachgewiesen werden (BARALDI et al., 2010). Neben Crotonaldehyd entstehen auf diesem Weg noch weitere α,β -ungesättigte Aldehyde wie z.B. 4-Hydroxynonenal oder 4-Oxononenal. 4-Hydroxynonenal zählt zu den

reaktivsten endogen gebildeten Aldehyden und entsteht beim Abbau von ω 6-Fettsäuren, wie der Linol- und der Arachidonsäure. Zu diesen Abbauprodukten zählt auch 4-Oxononenal. Die mittlere effektive Konzentration von 4-Hydroxynonenal ist jedoch zehnfach höher als jene von 4-Oxononenal (TREVISANI et al., 2007; TAYLOR-CLARK et al., 2008).

STRAUS & GLASS (2001) konnten zeigen, dass einige Prostaglandine (PG) nozizeptive Neurone unabhängig von Prostaglandin-Rezeptoren aktivieren. Dazu zählen PGA_1 , PGA_2 , PGJ_2 , 15-d-PGJ_2 , 8-sio-PGA_2 und $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$, die allesamt α,β -ungesättigte Gruppen besitzen, die zu einer kovalenten Bindung am N-Terminus des TRPA1-Rezeptors und somit zu dessen Aktivierung fähig sind (TAYLOR-CLARK & UNDEM, 2008).

Medikamenten-vermittelte Aktivierung von TRPA1

Neben den bereits beschriebenen exogenen TRPA1-Agonisten zeigen einige Medikamente neben ihrer vorgesehenen Wirkung auch Wirkung am TRPA1-Rezeptor. Dazu zählt zum Beispiel Cyclophosphamid, ein Zytostatikum, durch eine indirekte Interaktion seines Metaboliten Acrolein (GEPPETTI et al., 2008). Auch einige nichtsteroidale Antiphlogistika, wie Ketoprofen, Diclofenac und Indomethacin, interagieren mit dem TRPA1-Rezeptor (HU et al., 2010).

Neben diesen Medikamenten wurden auch einige Injektions- und Inhalationsnarkotika, deren primäre Wirkung auf das Zentrale Nervensystem abzielt, als Agonisten beschrieben. Die Injektionsnarkotika Propofol und Etomidat verursachen bei 80-90% der Patienten bei der Injektion ein brennendes Gefühl. Auch die Inhalation von einigen Inhalationsnarkotika kann Husten auslösen. Der genaue Mechanismus, durch den der Ionenkanal geöffnet wird, ist noch unklar, aufgrund der nicht-elektrophilen Eigenschaft dieser Substanzen ist eine Aktivierung durch eine kovalente Bindung am intrazellulären N-Terminus des Rezeptors jedoch unwahrscheinlich (MATTA et al., 2008; EILERS et al., 2010).

Weitere Medikamente, bei denen eine Wirkung am TRPA1-Rezeptor beschrieben ist, sind zum Beispiel Clotrimazol, Icilin oder Dibenzoazepine, auf die jedoch nicht weiter eingegangen werden soll.

1.3.1.4 Antagonisten von TRPA1

Ebenso wie TRPA1 von unterschiedlichen Substanzen aktiviert werden kann, kann der Ionenkanal TRPA1 auch durch sehr unterschiedliche organische und anorganische Stoffen geblockt werden. Dazu zählen zum Beispiel Gentamicin, ein Aminoglycosid-Antibiotikum, oder Ruthenium Red, ein anorganischer Farbstoff, die als unspezifische TRP-Kanalblocker agieren (STORY et al., 2003; ANDRÉ et al., 2009).

Eine weitere, als Antagonist bekannte Substanz ist Campher, ein Stoff der aus dem Kampferbaum (*Cinnamomum camphora*) stammt (XU et al. 2005). Ein Campher strukturell ähnlicher Stoff, nämlich Mecamylamine, ein Inhibitor der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, ist ebenfalls in der Lage, TRPA1 zu inhibieren (TALAVERA et al., 2009).

Hydra Biosciences fand auf der Suche nach einem selektiven TRPA1-Agonisten eine auf Xanthin basierende Substanz (HC-030031), die in der Lage war, sowohl einen AITC- als auch einen Formalin-induzierten intrazellulären Kalziumanstieg in TRPA1-exprimierenden Zellen zu blocken (EID et al., 2008).

Eine andere Arbeitsgruppe fand auf Oximen (organische Verbindungen die C=N-OH als funktionelle Gruppe enthalten) basierende Stoffe, die eine durch CA vermittelte Aktivierung von humanen TRPA1-Kanälen blockieren konnten (PETRUS et al., 2007). Von diesen Substanzen wurde AP-18 weiter charakterisiert und seine Eigenschaft als selektiver TRPA1-Inhibitor bestätigt (DEFALCO et al., 2010). Dazu wurde die Wirkungslosigkeit von AP-18 an TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 und TRPM8 gezeigt und so auf die Selektivität des Antagonisten geschlossen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass AP-18 sowohl bei humanen als auch bei murinen TRPA1-Rezeptoren als Antagonist wirkt, wobei die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) 3,1 μ M bzw. 4,5 μ M beträgt (DEFALCO et al., 2010).

1.3.1.5 TRPA1-Kanäle in den Atemwegen

TRPA1-Kanäle werden von den C-Faser-Neuronen, welche die Atemwege innervieren, exprimiert. Deren Aktivierung führt zu einem Kalziumeinstrom in den bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen (NASSENSTEIN et al., 2008) und löst so Aktionspotentiale in diesen Neuronen aus, wodurch unter anderem Husten ausgelöst wird (BIRRELL et al., 2009). Somit scheint dieser Rezeptor ein Teil des Schutzmechanismus der Lunge zu sein. In der Tat ist die Aktivierung des TRPA1-Kanals eine Schlüsselkomponente beim Auslösen von Husten durch Schadstoffe in der Atemluft (MUROI et al., 2013), was eine Beteiligung des Rezeptors beim Schutz der Lunge vor Umweltirritantien vermuten lässt. Diese Umweltirritantien sind auch in der Lage, asthmaähnliche Symptome wie Dyspnoe und in weiterer Folge eine Hypersensibilität gegenüber chemischen und physischen Reizen auszulösen (PRETI et al., 2012). Ebenfalls wurde eine Beteiligung von TRPA1-Kanälen an der späten Phase des Asthmas gezeigt, wobei durch eine Blockade der TRPA1-Kanäle eine Ovalbumin-induzierte späte asthmatische Reaktion sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus unterdrückt werden konnte (RAEMDONCK et al., 2012). Neben der Reaktion von TRPA1-Kanälen auf exogene

Irritantien wird auch eine Beteiligung an der Regulation des Muskeltonus der Atemwegsmuskulatur vermutet. So führt die Aktivierung von TRPA1-Kanälen zu einer Bronchokonstriktion bei isolierten Meerschweinchentracheen. Diese wird durch eine Neuropeptidfreisetzung über den axonalen Reflex vermittelt (ANDRÈ et al., 2008). Es scheint also, dass TRPA1-Kanäle neben dem Hustenreflex auch eine Bronchokonstriktion als Schutzreflex triggern. Dieser Schutzreflex könnte während einer Atemwegserkrankung am Phänotyp dieser Erkrankung beteiligt sein (GRACE et al., 2014).

1.4 Ziel der Arbeit

Der Respirationsapparat der Säuger ist durch sensorische Neurone dicht innerviert. Die Aktivierung dieser Neurone durch irritative oder inflammatorische Stimuli löst zentrale und periphere Schutzreflexe, wie Husten, Mukussekretion und Bronchokonstriktion, aus (CANNING, 2006). Von den in den Atemwegen exprimierten TRP-Kanälen sind vor allem TRPV1 und TRPA1 als Sensoren für schädliche Umweltirritantien in den Fokus der Forschung gerückt. Die Fähigkeit von TRPA1, auf eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen zu reagieren, sowie der Einfluss des Rezeptors auf den Muskeltonus der glatten Muskulatur (ANDRÈ et al., 2008) lassen eine Beteiligung dieses TRP-Kanals an der Schutzfunktion der Lunge vermuten (GRACE et al., 2014). Im Gegensatz dazu wurde eine widersprüchliche Beobachtung mit Hilfe der Head-Out-Bodyplethysmographie bei der Maus gemacht. Dabei wurde anstelle der erwarteten Bronchokonstriktion eine Bronchodilatation nach der Inhalation von CA, einem elektrophilen TRPA1-Agonist, beobachtet (kommuniziert von Ch. NASSENSTEIN, Gießen), wobei der Signalweg, über den die Bronchodilatation vermittelt wird, unbekannt ist.

Als Ausgangshypothese wird angenommen, dass TRPA1-Agonisten, wie CA, eine Bronchokonstriktion über periphere Mechanismen auslösen. Zur Überprüfung der Hypothese soll die Reaktion von explantierten Mäusetracheen auf Stimulation mit TRPA1-Agonisten im Organbad untersucht werden. In weiterer Folge soll zusätzlich der Einfluss von TRPA1-Antagonisten auf die Reaktion der Trachealstücke auf CA untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurde Gewebe von 10–56 Wochen alten Mäusen beiderlei Geschlechts verwendet, die im Zuge verschiedener, vom Regierungspräsidium Gießen genehmigter Versuche mit den Nummern GI 20/23-Nr.A7/2013, GI 20/23-Nr.A9/2013, GI 20/23-NR.A6/2013, GI 20/23-Nr.29/2013, GI 20/23-NR.A27/2013 sowie von der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen registrierten Tiertötungen mit den Nummern 425_M, 434_M und 426_M getötet wurden, verwendet.

Bis zur Gewebeentnahme wurden die Tiere in isoliert belüfteten Käfigen in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums Seltersberg sowie im Tierstall des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen gehalten. Während dieser Zeit erhielten die Tiere unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser und waren einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus ausgesetzt. Alle Käfige waren mit 1-4 Tieren besetzt und mit einem Häuschen, Nistmaterial und einem Nageholz ausgestattet.

Die in den Organbadversuchen verwendeten Trachealabschnitte von TRPA1-Knockout-Mäusen stammen aus Tieren, die am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg gezüchtet und gehalten wurden. Diese Tiere wurden im Rahmen dort laufender Versuche getötet, die Tracheen entnommen und in Minimal Essential Medium (MEM) für die weiteren Versuche nach Gießen überstellt.

Die vorgenommenen Eingriffe sowie die Tötung der Tiere wurden im Tier-OP des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen durchgeführt und werden nachfolgend genauer beschrieben. Alle Eingriffe, sowie die Tötung der Tiere, erfolgten gemäß den Vorgaben der Satzung der JLU Gießen zur Umsetzung des Tierschutzgesetzes.

2.2 Retrogrades Markieren der sensorischen, atemwegsinnervierenden Neurone

Pharmaka

Reagenzien	Hersteller	Ort
Atipamezol	Orion Cooperation	Espoo, FI
Fentanyl	Hameln Pharma Plus GmbH	Hameln, D
Flumazenil	Inresa Arzneimittel GmbH	Freiburg, D
Metedomitin	Orion Cooperation	Espoo, FI
Midazolam	Roche Pharma AG	Grenzach-Wyhlen, D
Naloxon	Inresa Arzneimittel GmbH	Freiburg, D

Tabelle 1: Pharmaka für das retrograde Markieren der sensorischen, atemwegsinnervierenden Neurone

Dosierung der Medikamente

Anästhesie: Metedomidin [0,5 mg/kg], Fentanyl [0,05 mg/kg], Midazolam [5 mg/kg]

Antagonisten: Atipamezol [2,5 mg/kg], Naloxon [1,2 mg/kg], Flumazenil [0,5 mg/kg]

Durchführung

Nur ein Teil der Neurone des proximalen und distalen Ganglions des N. vagus sind atemwegsinnervierende Neurone, weshalb diese für Versuche auf Einzelzellbasis markiert werden mussten. Dazu wurde der Farbstoff Aminostilbamidine den Tieren unter Allgemeinanästhesie pharyngeal verabreicht und durch retrograden Transport die atemwegsinnervierenden Neurone angefärbt.

Vor der Applikation wurden die Narkotika mit steriler 0,9%iger-NaCl-Lösung auf ein Endvolumen von 10 µl/g Mausgewicht verdünnt und intraperitoneal verabreicht. Nach dem Wirkungseintritt der Anästhesie wurden die Tiere auf einer speziellen Vorrichtung in Rückenlage fixiert, der Kopf übersteckt und die Zunge mit einem abgebogenen Spatel, der als Laryngoskop diente, zur Seite gedrückt, um die Mundhöhle auf Speisereste zu untersuchen. Anschließend wurden 50 µl der 0,05%igen Aminostilbamidine-Lösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) pharyngeal appliziert und dem Tier die Nase zugehalten bis der Farbstoff aspiriert wurde. Zur besseren Verteilung des Aminostilbamidine wurden die Mäuse für etwa eine Minute in dieser Position belassen. Anschließend wurde die Narkose mittels subkutaner Injektion der Antagonisten (10 µl/g Mausgewicht) aufgehoben. Während der Aufwachphase wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte unter Abschirmung von externen Reizen bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

2.3 Entnahme des Gewebes

2.3.1 Tötung der Tiere

Alle Tiere wurden unter Isofluran-Narkose durch Entbluten getötet. Als Narkosekammer diente ein ca. 1 l-fassendes Becherglas mit einer Glaspetrischale (Durchmesser 100 mm) als Deckel. In der Mitte der Petrischale wurde ein Wattebausch befestigt, der mit 0,2-0,3 ml Isofluran (Abott GmbH & CoKG, Wiesbaden, D) getränkt war und so als Verdampfer diente. Das Isofluran verdampfte innerhalb kürzester Zeit, sodass eine Konzentration von 4-5 %VOL im Gefäß erreicht wurde. Dies führte zu einem raschen Einschlafen der Tiere. Sobald die Atmung sistierte und die Tiere keine Reflexe mehr zeigten, wurde das Abdomen an der Linea alba eröffnet und die Vena cava caudalis durchtrennt. Nach dem Entbluten wurde das Gewebe wie nachfolgend beschrieben entnommen.

2.3.2 Präparation des proximalen und distalen Ganglions des N. vagus sowie der Spinalganglien

Zur Entnahme des proximalen und distalen Ganglions des N. vagus, die bei der Maus als Komplex vorliegen, sowie der Spinalganglien wurde ein dorsaler Zugang gewählt. Dazu wurde die Maus in Brustbauchlage gelagert und eine Inzision der Haut über dem cranialen Os frontale bis zum Kreuzbein gesetzt.

Präparation des distalen und proximalen Ganglions

Mit einem Skalpell wurde die Wirbelsäule auf Höhe der Articulatio atlantooccipitalis vom Schädel getrennt. Danach wurde die Schädelhöhle durch bilaterale Schnitte zwischen Os temporale und Os parietale, die nach cranial durch das Os frontale und nach caudal bis in das Foramen magnum verlängert wurden, eröffnet und das Gehirn entfernt. Um an die extracranial gelegenen Ganglien zu gelangen, wurde das Os temporale beidseits mit einer Irisschere zerstört und die Bulla tympani nach rostral mobilisiert. Im Anschluss wurden Ganglien durch leichten Zug am N. vagus aus dem nun zugänglichen Foramen jugulare vorverlagert und entnommen.

Präparation der Spinalganglien

Mit einem Skalpell wurde die oberflächliche Muskulatur sowie die autochthone Rückenmuskulatur von der Wirbelsäule abpräpariert und der Canalis vertebralis mit einer Irisschere bilateral zwischen den Gelenkfortsätzen und den Querfortsätzen eröffnet. Die Spinalganglien wurden nacheinander durch leichten Zug an der Dura mater auf der

ipsilateralen Seite des zu entnehmenden Spinalganglions in die Foramina intervertebralia verlagert und entnommen.

2.3.3 Präparation der Trachea und des Thoraxpakets

Zur Entnahme der Tracheen wurden die Tiere in Rücklage fixiert und der Hautschnitt vom Kinnschneise bis zum caudalen Abdomen durchgeführt. Ausgehend vom Abdomen wurde der Thorax durch das Entfernen des Zwerchfells eröffnet und das Sternum sowie die ventralen zwei Drittel der Rippen mit einer Irisschere zusammen mit der ventralen Halsmuskulatur entfernt. Mit einer Federschere wurde die nun freiliegende Trachea vom Bindegewebe befreit. Danach wurde die Trachea für das Organbad entnommen.

2.4 Organbad

Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Ort
2-Aminoethyldiphenylborat (2-APB)	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Acetyl- β -Methylcholin Chlorid	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Acrolein	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Allylisothiocyanat (AITC)	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
AP-18	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Carvacrol	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Ethanol	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
HC-030031	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Iberiotoxin	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Indomethacin	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Minimum Essential Medium (MEM)	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
NG-Nitro-L-Arginin (L-NNA)	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Propranolol	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
RP-67580	Tocris Bioscience	Bristol, UK
Ruthenium Red	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Tetrodotoxin	Biotrend Chemikalien GmbH	Köln, D
Thymol	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Zimtaldehyd (CA)	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D

Tabelle 2: In den Organbadversuchen verwendete Reagenzien und Medien

Material

Organbad [Radnoti, Californien, USA]

Force Transducer [ADInstruments, Oxford, UK]

Signalverstärker [ADInstruments, Oxford, UK]

Software Labchart 7.0 [ADInstruments, Oxford, UK]

Signalwandler [Ugo Basile, Comerio, Italien]

Durchführung

Die Tracheen wurden wie oben beschrieben freipräpariert und der Teil zwischen der fünften und elften Knorpelspange entnommen. Die entnommenen Trachealabschnitte wurden in ein mit 10 ml MEM gefülltes Greiner-Röhrchen verbracht und im Wärmeschrank bei 37°C bis

zum Versuchsbeginn inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Tracheen mit einem Gasmisch aus Sauerstoff (95%) und Kohlendioxid (5%) begast.

Zur Messung der Kontraktion der Trachealmuskulatur wurden die Tracheen an zwei Haken befestigt, in dem diese von je einer Seite durch das Tracheallumen geschoben wurden (Abbildung 2.1). An einem der Haken wurde ein dünner Faden angebracht, der an einem Kraftwandler befestigt war; das andere Haken wurde an der Apparatur befestigt. Das Gewebestück wurde in der Organbad-Kammer (50 ml) so versenkt, dass es komplett mit MEM bedeckt war. Vor Versuchsbeginn wurde das Trachealstück mit 300 mg vorgespannt und für mindestens 30 Minuten äquilibriert. Während des gesamten Versuchsaufbaus wurde die Kammer mit einem Gasmisch aus Sauerstoff (95%) und Kohlendioxid (5%) begast. Die unterschiedlichen Versuchsprotokolle sind nachfolgend beschrieben.

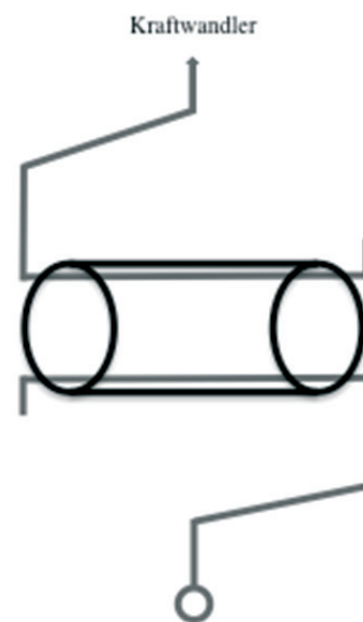


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Befestigung der Trachealstücke im Organbad

2.4.1 Wirkung des TRPA1-Agonisten CA auf murine Trachealstücke

Ausgehend von der Hypothese, dass TRPA1-Agonisten eine Bronchokonstriktion bewirken, werden die Trachealstücke wie beschrieben in das Organbad eingespannt und für 30 Minuten äquilibriert. Um eine Relaxation deutlich zu sehen, wurde in diesem Versuch die Vorspannung von 300 mg auf 500 mg erhöht. Anschließend wurden drei unterschiedliche Konzentrationen von CA (Tabelle 2) appliziert und die Reaktion des Gewebestücks aufgezeichnet (Abbildung 2.2).

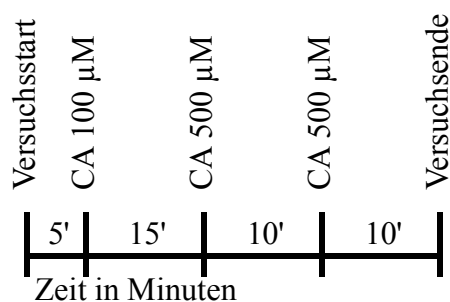


Abbildung 2.2: Versuchsablauf zur Untersuchung der Wirkung von TRPA1-Agonisten auf die Trachealstücke. CA, Zimtaldehyd.

2.4.2 Erstellung der Dosiskurven für TRPA1-Agonisten

Um die Reaktion der vorkontrahierten Tracheen auf TRPA1-Agonisten zu prüfen, wurde zunächst MCH (100 μ M, gelöst in Aqua ad injectabilia) appliziert und, wie nachfolgend dargestellt, aufsteigende Konzentrationen der TRPA1-Agonisten gegeben (Abbildung 2.3). Als Agonisten wurden CA, Acrolein, Carvacrol, 2-Aminoethyldiphenylborat (2-APB), Thymol und Allylisothiocyanat (Tabelle 2) verwendet.

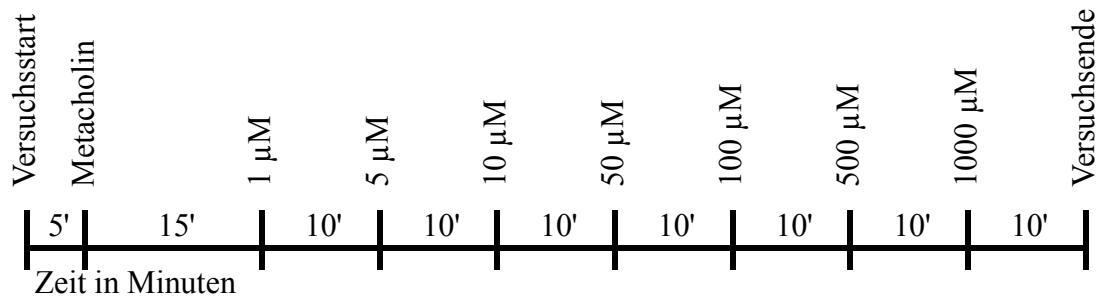


Abbildung 2.3: Versuchsablauf zur Bestimmung der Dosiskurve der verwendeten Agonisten im Organbad.

2.4.3 Untersuchung der Bedeutung von TRPA1 bei der beobachteten Relaxion

Untersuchung des Einflusses von TRPA1-Kanälen auf die Relaxation

Um die Ätiologie der Relaxation zu ermitteln, wurden verschiedene Signalwege durch Antagonisten ausgeschaltet. Dazu wurde der nachfolgend abgebildete Versuchsablauf verwendet (Abbildung 2.4). Als Antagonisten wurden Iberiotoxin (1 nM), ein Blocker der Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle, Indomethacin (5 μ M), ein nicht-selektiver Hemmer der Cyclooxygenasen (COX), Ruthenium Red (30 μ M), ein nicht selektiver TRPA1-Kanal Blocker, AP-18 (30 μ M) sowie HC-030031 (100 μ M), beides selektive TRPA1-Antagonisten, RP-67580 (20 nM), ein Neurokinin 1 (NK₁)-Rezeptor Antagonist, Tetrodotoxin (100 nM), ein Blocker der spannungsaktiven Natriumkanäle, N^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA; 10 μ M), ein Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Inhibitor, und Propranolol (10 μ M), ein Antagonist des adrenergen β_2 -Rezeptors, verwendet.

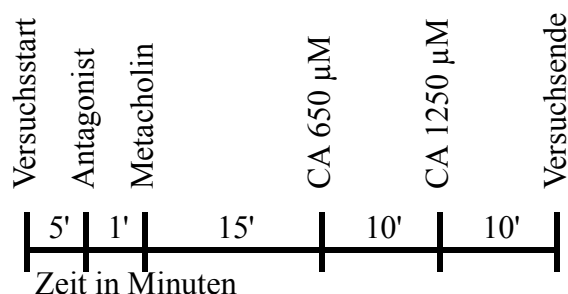


Abbildung 2.4: Versuchsablauf zur Ermittlung der Unterschiede in der Relaxation der verschiedenen Antagonisten und der TRPA1-Knockout Mäuse. CA, Zimtaldehyd.

Untersuchung des Einflusses der sensorischen C-Faser-Neurone auf die Relaxation

Da die TRPA1-Expression nicht auf sensorische Neuronen beschränkt ist, sollte durch eine organotypische Kultur die Bedeutung von TRPA1 in sensorischen Neuronen untersucht werden. Dazu wurden die Trachealstücke nach der Entnahme freipräpariert und für 5 Tage in MEM bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Trachealstücke mit einem Gasmisch aus Sauerstoff (95%) und Kohlendioxid (5%) begast und das MEM täglich gewechselt. Am fünften Tag wurden die Trachealstücke mit dem in Abbildung 2.5 dargestellten Protokoll im Organbad auf ihre Reaktion untersucht. Nach dem Versuch wurden die Proben für eine spätere immunhistologische Untersuchung zur Effektivität der organotypischen Kultur, auf das Vorhandensein von C-Faser-Neuronen fixiert (siehe Immunhistochemie).

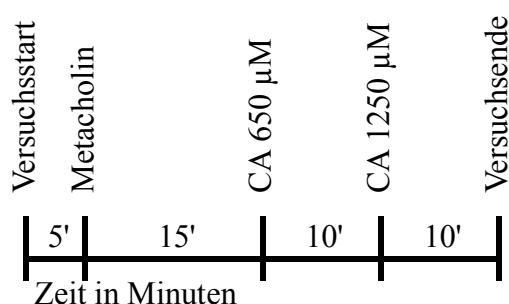


Abbildung 2.5: Protokoll zur Untersuchung der inkubierten Trachealstücke. CA, Zimtaldehyd.

Untersuchung des Einflusses des Epithels auf die Relaxation

Um die Bedeutung des Epithels auf die Relaxation zu ermitteln, wurde das Epithel nach der Entnahme des Trachealabschnitts mit Hilfe einer handelsüblichen Interdentalebürste vorsichtig von den Trachealstücken abgerubbelt. Dazu wurde das Trachealstück sofort nach der Entnahme in eine MEM gefüllte Glaspetrischale überführt. Danach wurde das Trachealstück mit einer Pinzette fixiert und das Epithel mit der Interdentalebürste entfernt. Die so vom Epithel befreiten Trachealstücke wurde mit dem in Abbildung 2.5 dargestellten

Versuchsaufbau auf ihre CA-induzierte Relaxation untersucht. Nach dem Versuch wurden die Trachealstücke für die spätere histologische Untersuchung fixiert.

2.4.4 Auswertung der Organbadversuche

Mit Hilfe eines Computerprogramms (LabChart 7.0) wurde die Kontraktionskraft der Trachealstücke im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Diese Werte wurden vom Computerprogramm so umgewandelt, dass alle 30 Sekunden ein Messwert ausgegeben wurde. Diese Messwerte wurden in Microsoft Excel übertragen und eine Kurve erstellt. Dazu wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler (Standard Error of Mean, SEM) der einzelnen Messpunkte errechnet und die Dosiswirkungskurve mit Hilfe des Mittelwerts und des SEM dargestellt (Abbildung 2.6).

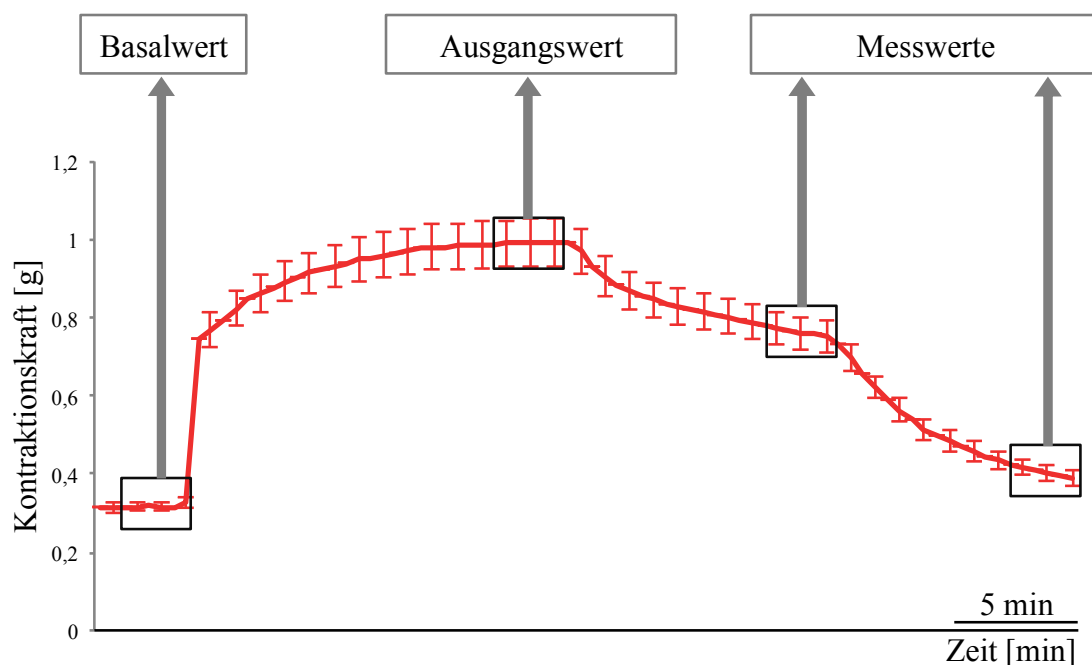


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung der Auswertung der gemessenen Kontraktionskraft der Tracheen in den Organbadversuchen. Dargestellt sind der Mittelwerte und SEM anhand einer Beispielkurve.

Um die Wirkung der unterschiedlichen Blocker bzw. der Agonisten zu vergleichen, wurde der Mittelwert der jeweils letzten drei Messwerte nach Stimulation als Messwert und der Mittelwert der letzten drei Messwerte nach MCH-Stimulation als Ausgangswert definiert (Abbildung 2.6). Anschließend wurde für alle Messwerte die Relaxation in Prozent der maximalen Kontraktion mit der Formel:

$$Relaxation [\%] = \frac{Messwert - Ausgangswert}{Basalwert - Ausgangswert} * 100$$

berechnet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Variablen und dem Wilcoxon-Rangsummentest für abhängige Variablen auf Signifikanz geprüft (SPSS 21, IBM, Armonk, USA). Mit Hilfe von Box-Plots (SPSS 21) wurden die Werte der Fünf-Punkte-Zusammenfassung, also der Median, die Werte des unteren und oberen Quartil und die beiden Extremwerte vergleichend dargestellt.

2.5 Immunhistochemie

Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Ort
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Glycerin	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & CoKG	Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH) 2 M	Merck KGaA	Darmstadt, D
Pferdeserum	PAA Laboratories GmbH	Cölbe, D
Rinderserum	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Salzsäure 37 % (HCl)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Tween® 20	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D

Tabelle 3: Für die Immunhistochemie verwendete Reagenzien.

Material

TissueTek® O.C.T.™ Compound [Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL]

Tissue-Tek® Cryomold [Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL]

Kryostat [Microm HM560, Microm International GmbH, Walldorf, D]

Objekträger [SuperFrost® +, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, D]

Deckgläser [Deckgläser 24 x 60 mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, D]

Fluoreszenzmikroskop [Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Göttingen, D]

Fettstift [Liquid Blocker, Science Service GmbH, München, D]

Antikörper

Kaninchen anti- α -CGRP (A13093; 1:36.000) [Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA]

Kaninchen anti-TRPV3 (ACC-033; 1:1600) [Alomone Labs, Jerusalem, Israel]

Esel anti-Kaninchen-Ig, Cy3-konjugiert (AP182C; 1:2.000) [EMD Millipore Corp., Temecula, USA]

Stammlösung A

Zur Herstellung der Stammlösung A wurden 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ in einem Liter Aqua destillata gelöst.

Stammlösung B

Zur Herstellung der Stammlösung B wurden 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ in einem Liter Aqua destillata gelöst.

Phosphat-Puffer, 0,1 M (0,1 M PP)

Zur Herstellung einer 0,1 M Phosphatpufferlösung wurden 115 ml Stammlösung A mit 385 ml der Stammlösung B gemischt und mit Aqua destillata auf einen Liter aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Phosphat-Puffer, 0,2 M (0,2 M PP)

Zur Herstellung einer 0,2 M PP-Lösung wurden 330 ml Stammlösung A mit 770 ml der Stammlösung B gemischt und der pH-Wert mit Hilfe von Natronlauge (NaOH) und Salzsäure (HCl) auf 7,4 eingestellt.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS)

Zur Herstellung der phosphatgepufferten Kochsalzlösung wurden 22,4 g NaCl in 4,5 Liter Aqua destillata gelöst. Anschließend wurden 28,75 ml der Stammlösung A sowie 96,20 ml der Stammlösung B hinzugegeben und der pH-Wert mit Hilfe von NaOH und HCl auf 7,4 eingestellt. Zum Schluss wurde das Volumen mit Aqua destillata auf 5 Liter aufgefüllt.

Blocklösung

Die Blocklösung, die in der Immunhistologie verwendet wurde, um die Zellmembran zu permeabilisieren und unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen, setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 10 % Normales Pferdeserum, 0,1 % Rinderserum und 0,5 % Tween® 20 in PBS.

Carbonat-gepuffertes Glycerin

Zur Herstellung der Glycerin-Lösung wurden 50 ml einer 1,5 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung (NaHCO_3) mit einer 1,5 M Dinatriumcarbonat-Lösung (Na_2CO_3) auf einen pH-Wert von 8,6 eingestellt. Ein Teil dieser Pufferlösung wurde mit zwei Teilen Glycerin gemischt.

4 %-Paraformaldehyd-Lösung (PFA)

Zur Herstellung der 4%igen PFA-Lösung wurden zuerst 40 g PFA in 500 ml Aqua destillata langsam auf ca. 70°C erhitzt und einige Tropfen einer 2 M Natronlauge hinzugegeben, bis die

Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen wurden 500 ml einer 0,2 M PP-Lösung hinzugegeben und der pH auf 7,2-7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert.

Zamboni's Fixans

Zur Herstellung des Zamboni's Fixans wurden 50 ml einer 37%igen Formalinlösung mit 500 ml einer 0,2 M PP-Lösung und 150 ml gesättigter Pikrinsäure gemischt und anschließend mit Aqua destillata auf 1000 ml aufgefüllt.

2.5.1 Probenaufarbeitung

Die Tracheen wurden nach dem Organbadversuch in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Zamboni's Fixans für 12 Stunden bei 4°C fixiert und anschließend mit einer 0,1 M PP-Lösung fünfmal ausgewaschen. Die fixierten und gewaschenen Tracheen wurden in einem Cryomold platziert, mit O.C.T.-Compound bedeckt und eingefroren. Dazu wurde Isopentan mit Flüssigstickstoff gekühlt und darin das Cryomold gefroren. Anschließend wurden die Probenstücke aus den Cryomolds entnommen und mit Hilfe des O.C.T.-Compound auf Filterpapier festgefroren und beschriftet. Bis zum Anfertigen der Schnitte wurden die eingebetteten Tracheen bei -20°C aufbewahrt.

Die eingebetteten Tracheen wurden so in den Kryostaten eingespannt, dass transversale Schnitte der Proben angefertigt werden konnten, und die Kammertemperatur des Kryostaten auf -20°C eingestellt. Die Temperatur des Schneidemessers wurde um 2°C wärmer gewählt als die der Kammer. Es wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Superfrost Objektträger überführt. Die fertigen Schnitte wurden für 60 Minuten getrocknet und bis zum Färben bei -20°C gelagert.

2.5.2 Immunhistochemische Inkubation

Die wieder aufgetauten Schnitte wurden für eine Stunde getrocknet. Die trockenen Proben wurden mit einem Fettstift umrandet und für eine Stunde mit Blocklösung bedeckt. Danach wurde die Blocklösung abgesaugt und die Schnitte mit dem Primärantikörper (Kaninchen anti- α -CGRP, Verdünnung 1:36.000 oder Kaninchen anti-TRPV3, Verdünnung 1:1600) eingedeckt. Um die Schnitte während der Inkubation vor dem Austrocknen zu schützen, wurden diese in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Dann wurde der Primärantikörper abgesaugt und die Präparate mit PBS gewaschen (2x10 Minuten). Anschließend wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper (Esel anti-Kaninchen-Ig, Cy3-konjugiert, Verdünnung 1:2000) bedeckt und eine weitere Stunde im Dunkeln

inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper abgesaugt und die Proben ein weiteres Mal gewaschen (PBS 2x10 Minuten). Zur Fixierung der Antikörper wurden die Präparate für 10 Minuten in 4%-PFA-Lösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang (PBS 2x10 Minuten) wurden die Präparate mit Carbonat-gepuffertes Glycerin eingedeckt. Bis zur zeitnahen Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Kalziumimaging

Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Ort
Acetyl- β -Methylcholinchlorid (MCH)	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Capsaicin		
Dimethylsulfoxide (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, D
Dispase II	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, D
Glukose	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Fura-2-AM	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Kollagenase	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Laminin Mouse Protein (0,5 mg/ml)	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Leibovitz-15 Medium (L-15, phenolrot)	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Minimum Essential Medium (MEM)	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & CoKG	Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Zimtaldehyd	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D

Tabelle 4: Für das Kalziumimaging verwendete Reagenzien.

Material

Glaspipetten [Science Products GmbH, Hofheim, D]

Mikroskop [EX50WI, Olympus, Tokio, JP]

Kamera [Imago, Till Photonics GmbH, Gräfelfing, D]

Monochromator [Polychrome 2, Photonics,,D]

Software [TILLvisION, Till Photonics GmbH, Gräfelfing, D]

Objektträgerheizung [Delta 3TC3, Bioprotechs Inc., Butler, USA]

Peristaltik Pumpe Minipuls 2 [Gilson Inc., Wisconsin, USA]

Deckgläschen [12 mm & 18 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D]

Locke-Lösung

Zur Herstellung der Locke-Lösung wurden NaCl (136 mM), KCl (5,6 mM), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ (1,2 mM), NaHCO_3 (14,3 mM), Glukose (10 mM) sowie 1,2 ml einer 1 M MgCl_2 -Lösung (entspricht 1,2 mM) in 800 ml Aqua destillata gelöst. Vor dem Hinzufügen von CaCl_2 wurde die Lösung für mindestens eine halbe Stunde mit Sauerstoff begast. Anschließend wurden 2,2 mM Kalziumchlorid (CaCl_2) hinzugefügt und die Lösung mit Aqua destillata auf einen Liter aufgefüllt.

L15-Medium + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin

Vor der Herstellung der Lösung wurde das Fetale Kälberserum (FCS) für 30 Minuten im 56°C-warmen Wasserbad inaktiviert. Dem (für den Waschgang sowie die Inkubation über Nacht verwendeten) L15-Medium (450 ml) wurden vor dem Gebrauch 5 ml einer 1 %igen Penicillin/Streptomycin-Lösung sowie 50 ml hitzeinaktiviertes FCS hinzugefügt.

Für die Inkubation mit Fura-2 wurde L15-Medium mit 20 % FCS verwendet. Dazu wurden 5 ml des FCS in ein 50 ml Greiner-Röhrchen pipettiert und mit 10 %iger FCS + L15-medium + Penicillin/Streptomycin-Lösung auf 50 ml aufgefüllt.

Fura-2

50 µg des Farbstoffs Fura-2-AM wurden in 50 µl DMSO (1,2 mM) gelöst und bei -20°C gelagert. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes durch Licht zu verhindern, wurde das Reaktionsgefäß mit dem Farbstoff während des Gebrauchs mit Alufolie umwickelt.

Beschichten der Deckgläschen mit Laminin und Poly-L-Lysin

Um die Deckgläschen für die Zellkultur vorzubereiten, wurden Deckgläschen (12 mm Durchmesser) mit Laminin und Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden 100 µl der Laminin-Lösung (0,5 mg/ml) mit 5 ml der Poly-L-Lysin-Lösung (0,2 mg/ml) und mit Aqua destillata

auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde auf die Deckgläschen so aufgetragen, dass die Deckgläschen vollständig mit der Lösung bedeckt waren. Nach 24-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen dreimal mit Aqua destillata gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen getrocknet und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.1 Dissoziation von Zellen

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension von Neuronen aus den Spinalganglien und dem Ggl. nodosum jugulare wurden Dispase II (2 mg/ml) und Kollagenase (2 mg/ml) in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) gelöst und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Gewebe, wie unter Punkt 2.3.2 beschrieben, entnommen und in Dispase/Kollagenase-Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde bei 37°C in einem Wasserbad für 60 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten, 45 Minuten und am Ende der Inkubationszeit wurde die Enzymlösung mit den Ganglienzellen mehrmals in einer Glaspipette auf- und abpipettiert, wobei der Durchmesser der Glaspipettenspitze nach jedem Durchgang kleiner gewählt wurde, um das Gewebe zusätzlich mechanisch zu dissoziieren. Anschließend wurde die Suspension dreimal mit 15 ml L-15-Medium gewaschen und zwischen den Waschschritten bei 1000 U/min (179 g) zentrifugiert. Nach dem letzten Waschgang wurde der Überstand entfernt und das im Greiner-Röhrchen verbliebene Zellpellet mit 5 µl L-15 Medium pro Deckgläschen suspendiert. Die mit Laminin und Poly-L-Lysin vorbeschichteten Deckgläschen wurden in eine 24-well Mikrotiterplatte gebracht und jeweils 5 µl der Zellsuspension darauf aufgebracht. Aus den entnommenen Spinalganglien von einer Maus konnten genug Zellen dissoziiert werden, um diese auf 8-12 Deckgläschen auszusäen. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit je 500 µl L-15 Medium aufgefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen nicht vom Deckgläschen gespült wurden. Anschließend wurden die Zellen in einer feuchten Kammer über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.2 Kalziummessungen in den dissoziierten Neuronen

Um Änderungen in der cytosolischen Kalziumkonzentration im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, mussten die Zellen zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen werden. Dazu wurde das Medium, in dem Zellen wie unter Punkt 2.6 beschrieben über Nacht inkubiert wurden, abpipettiert und durch L-15 Medium mit darin gelösten Fura-2-AM (4 µM) ersetzt. Nach der Inkubationszeit von 30-40 Minuten wurde das Deckgläschen aus dem Well entnommen und in eine beheizte Messkammer eingespannt, die mit 2,5 ml vorgewärmter

Locke-Lösung gefüllt war. Mit Hilfe der Objektträgerheizung wurde die Temperatur der Messkammer konstant auf 34°C gehalten und während des Versuchs mit frischer Locke-Lösung perfundiert (500 ml/h). Diese wurde vor der Zugabe des Antagonisten bzw. der Kontrolle gestoppt und erst nach Zugeben von CA wieder eingeschaltet, um den Antagonisten nicht aus der Kammer zu waschen. Nach dem Versuch wurden die von der Software aufgenommenen Fluoreszenzbilder ausgewertet und die Reaktion der Zellen auf die Substanzen, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, ermittelt.

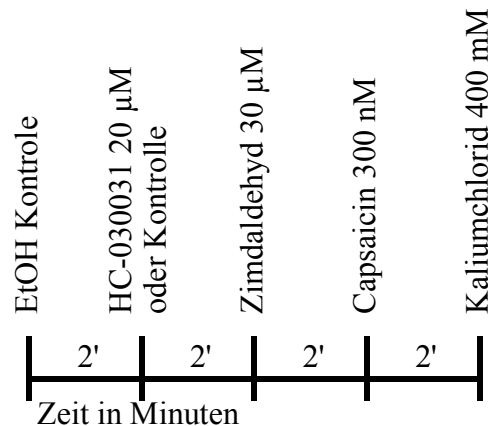


Abbildung 2.7: Verwendetes Protokoll im Kalziumimaging.

2.6.3 Auswertung der Kalziumimagingversuche

Die verwendete Software (TILLvisION) nahm während der Messung alle zwei Sekunden zwei Fluoreszenzbilder auf. Eines dieser Bilder wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm und das andere bei einer Wellenlänge von 380 nm aufgenommen. Während eines Versuchsschrittes wurden insgesamt 60 Bilderpaare aufgenommen, wobei 30 Bilderpaare vor der Stimulation und 30 Bilderpaare nach der Stimulation aufgenommen wurden. Am Versuchsende konnten die einzelnen Zellen mit Hilfe der Software markiert (Region of Interest; ROI), das Verhältnis der Lichtintensität für jedes Bilderpaar errechnet, und dieser Zahlenwert abgespeichert werden. Sobald alle Bilderpaare auf diesem Weg ausgewertet waren, wurden die Messwerte in Microsoft Excel übertragen und die absoluten Messwerte in prozentuale Werte umgerechnet. Der Mittelwert aus den Messwerten der ersten 30 Bilderpaare, welche vor der Stimulation aufgenommen wurden, wurde errechnet und als Referenzwert (Baseline) festgelegt. Die Reaktion einer Zelle wurde dann als positiv gewertet, wenn der maximale Anstieg mehr als 5 % betrug und der Mittelwert zusätzlich größer als der Baseline-Mittelwert plus der 2-fachen Standardabweichung war. Zellen, die bereits auf den Kontrollstimulus positiv reagierten, wurden nicht weiter ausgewertet. Anschließend wurden alle Zellen, die auf Kaliumchlorid und/oder Capsaicin reagierten, als lebende Zellen definiert.

(Gesamtzellzahl) und der Anteil der Capsaicin-positiven Zellen sowie der Capsaicin- und CA-positiven Zellen für beide Gruppen gezählt. Der Unterschied wurde mittels Chi-Quadrat-Vierfeldertest auf Signifikanz geprüft.

2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Ort
6x DNA Loader Dye	Thermo Scientific	Waltham, USA
Aqua ampuwa	Fresenius Medical	Bad Homburg, D
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, D
DNA Ladder Gene Ruler 100 bp	Thermo Scientific	Waltham, USA
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Essigsäure	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & CoKG	Karlsruhe, D
GeneAmp® RNA PCR Core Kit	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
Glycerin	Merk KGaA	Darmstadt, D
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen GmbH	Hilden, D
Mineralöl für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & CoKG	Karlsruhe, D
Orange G	Sigma Aldrich GmbH	Steinheim, D
Random Primers	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
RNAlater™ RNA Stabilization Reagent	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNeasy plus Micro Kit	Qiagen GmbH	Hilden, D
SuperScript II Cells Direct cDNA Synthesis Kit	Qiagen GmbH	Hilden, D
SuperScript III Cells Direct cDNA Synthesis Kit	Qiagen GmbH	Hilden, D
TissueTek® O.C.TTM Compound	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen Rijn, NL
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & CoKG	Karlsruhe, D

Tabelle 5: Für die PCR verwendete Reagenzien.

Material

Kugelmühle [Retsch MM300, Haan, D]

Mikroskop Zeiss Axioskop [Carl Zeiss GmbH, Göttingen, D]

Laser-Mikrodissektion [PALM MicroBeam, Carl Zeiss AG, Göttingen, D]

Mikropipetten-Puller P-97 [Sutter Instruments, Kalifornien, USA]

Glaspipetten [Science Products GmbH, Hofheim, D]

Kryostat [Microm HM560, Microm International GmbH, Walldorf, D]

Positionierungssystem MCL-3 [Lang GmbH & CoKG, Hüttenberg, D]

Peristaltikpumpe Minipuls 2 [Gilson Inc., Wisconsin, USA]

Tissue-Tek® Cryomold [Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL]
 Objekträger Membran Slide 1.0 PEN [Carl Zeiss GmbH, Göttingen, D]
 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker [UVP LLC., Upland, USA]
 Reagenzröhrchen [Eppendorf, Hamburg, D]
 Nanodrop 2000 [Nanodrop, Wilmington, USA]
 SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis System [Invitrogen, Hilden, D]
 Minicycler personal [Eppendorf, Hamburg, D]
 myFuge [Benchmark Scientific, Edison, USA]
 Heidolph Reax Top [Heidolph Instruments GmbH, Fürth, D]
 Mastercycler gradient [Eppendorf, Hamburg, D]
 PCR Röhrchen Strips 0,2 ml [Eppendorf, Hamburg, D]
 Gelsystem Mini L [PEQLAP, Erlangen, D]
 Spannungsquelle PS500XT [Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA]
 Geldokumentation [PHASE Gesell. für Phorese, Analytik und Separation mbH, Lübeck, D]

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Lösung

Zur Herstellung der 50x Stammlösung der TAE-Lösung wurden 242 g TRIS mit 100 ml EDTA und 57,1 ml Essigsäure vermengt und mit Aqua destillata auf einen Liter aufgefüllt. Diese Lösung wurde anschließen autoklaviert. Zur Herstellung der 1x TAE-Lösung wurde ein Teil der Stammlösung mit 49 Teilen Aqua destillata vermengt.

DNA-Leiter

Die DNA-Leiter für die Elektrophorese wurde wie folgt gemischt:

Reagenzien	Menge
DNA Ladder Gene Ruler 100bp	5 µl
6x DNA Loader Dye	10 µl
Aqua dest.	85 µl

Tabelle 6: Herstellung der DNA-Leiter

Probenauftragspuffer

Der Probenauftragspuffer für die Gelelektrophorese wurde wie folgt gemischt:

Reagenzien	Menge
Glycerin	25 ml
TAE-Lösung	25 ml
Orange G	10 mg

Tabelle 7: Herstellung des Probenauftragspuffers DNA-Leiter

2.7.1 cDNA-Synthese aus Einzelzellen mittels *cell picking*

Bevor die atemwegsinnervierenden Neurone des proximalen und distalen Ganglions des N. vagus gepickt werden konnten, wurden diese *in vivo* retrograd makiert (siehe Punkt 2.2) und wie beschrieben entnommen.

Die so gewonnenen Ganglien wurden dissoziiert (siehe Punkt 2.6) und auf 18 mm Deckgläschen ausgesät. Die durch axonalen Transport retrograd gefärbten Neurone wurden zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie identifiziert. Da der Fluoreszenzfarbstoff bei der Fluoreszenzmikroskopie sehr schnell ausbleicht, wurden die Neurone nach der Identifikation mit Hilfe konventioneller Lichtmikroskopie mit dem Mikromanipulator und der mit dem Mikropipetten-Puller hergestellten Glaspipetten mit einer Öffnung von ca. 50-70 µm gepickt. Dazu wurde die Mikropipettenspitze mit Hilfe des Mikromanipulators nahe an die Zelle manövriert und diese mittels Unterdruck in die Kapillare gezogen. Anschließend wurde die Spitze der Mikropipette mit der darin befindlichen Zelle in einem PCR-Röhrchen abgebrochen und auf diesem Weg die Zelle in das mit 1 µl RNase-Inhibitor (RNaseOut) gefüllten PCR-Röhrchen überführt. Die Proben wurden unmittelbar auf -20°C gekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank gelagert.

cDNA-Synthese

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte anhand der Herstellervorschriften mit Hilfe des SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis Kit, welches sich speziell zur cDNA-Synthese von Proben, bei denen zuvor keine RNA-Isolation stattgefunden hat, eignet. Die daraus gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.2 Laser-Mikrodissektion

Nach der Entnahme der Trachea wurde diese direkt in Cryomolds platziert, mit O.C.T.-Compound bedeckt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gefroren. Das eingebettete Gewebe

wurde wieder aus den Cryomold entnommen und auf Filterpapier festgefroren. Anschließend wurden mit dem Kryostaten 10 µm dicke, sagittale Schnitte der Tracheen angefertigt, wobei die Temperatur des Kryostaten auf -20°C und die des Schneidemessers auf -18°C eingestellt waren. Die Gewebeschnitte wurden auf die speziell für die Laser-Mikrodissektion gefertigten Objektträger (Membrane Slide) überführt. Diese mussten vor Gebrauch für 30 Minuten unter UV-Licht (254 nm) inkubiert werden. Die angefertigten Kryostatschnitte wurden auf die vorbehandelten Objektträger überführt und für 15 Minuten getrocknet. Die getrockneten Schnitte wurde Hämatoxylin gefärbt, mit Aqua ampupa gewaschen und mittels aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 100 %) entwässert und bis zur unmittelbaren Verwendung in 100%igen Alkohol auf Eis gelagert.

Der vorbereitete Objektträger sowie ein Reaktionsgefäß, in dessen Deckel 1 µl Mineralöl pipettiert wurde, wurden in das Laser-Dissektionsmikroskop eingespannt. Anschließend wurden mit Hilfe der Software die Schnittlinien des Lasers am Präparat eingezeichnet und die Zellen ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Zellen wurden vom Gerät automatisch in den Öltropfen des Mikroreaktionsgefäßes befördert und blieben dort haften. Mit dieser Technik wurden Epithelzellen und Muskelzellen in getrennten Mikroreaktionsgefäßen gesammelt. Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy plus Micro Kit nach Herstellerangaben.

cDNA-Synthese

Die auf diesen Weg gewonnene RNA wurde mit Hilfe des GeneAmp® RNA PCR Core Kit gemäß der Herstelleranleitung in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnen cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.3 cDNA-Synthese aus ganzen Gewebestücken

Die Gewebestücke wurden sofort nach der Entnahme in ein auf Eis gekühltes 2 ml-Mikroreaktionsgefäß mit einem Milliliter RNAlater™ verbracht. Anschließend wurde in jedes Mikroreaktionsgefäß eine Metallkugel mit einem Durchmesser von 3 mm gegeben und die Probe mit Hilfe einer Kugelmühle für 5 Minuten bei einer Frequenz von 30 Zyklen pro Sekunde mechanisch zerkleinert. Sofern die Probe nicht ausreichend zerkleinert war, wurde sie für weitere fünf Minuten in der Kugelmühle zerkleinert. Danach wurde die RNA mittels RNeasy Mikro Kit gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert und anschließend in cDNA umgeschrieben.

cDNA-Synthese

Nach der Extraktion der RNA aus dem Gewebe wurde die gewonnene RNA-Menge mit Hilfe des Nanodrop bestimmt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Mit Hilfe des Superscript II CellsDirect cDNA Synthesis System wurde die RNA gemäß der Herstelleranleitung in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.4 Ansetzen des Mastermix und Durchführung der PCR

Primer

Target	Primerpaar	Datenbank	Produktlänge (bp)
β-Actin	Forward: ccatcatgaagtgtgacgttga Reverse: catcgactctctgcttgctgat	NM_007393.3	249
TRP A1	Forward: ggagcagacatcaacagcac Reverse: gcaggggagcacttcttctc	NM_177781.4	393
TRP V1	Forward: gcgctaacggggacttctt Reverse: cttcagtgtgggtggagtt	NM_001001445.1	285
TRP V3	Forward: gcaacaacgatgggctcac Reverse: ggtagcagctctcatgctcgt	NM_145099.2	254

Tabelle 8: Für die PCR verwendete Primer. Alle verwendeten Primer waren Intron spannend.

Mastermix

Für die Polymerasekettenreaktion wurde der HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) verwendet. Der Master Mix wurde wie folgt laut Gebrauchsanleitung des Herstellers gemischt. Bei allen Versuchen wurden Negativkontrollen der Primer sowie Negativkontrollen der cDNA („-RT“-Kontrollen, bei denen die Probe ohne den RT-Schnitt weiter verarbeitet wurde) mit angesetzt. Dazu wurde die cDNA durch Aqua destillata ersetzt.

Reagenzien	Menge
Aqua destillata (Ampuwa®)	15,1 µl
10xPCR-Buffer*	2,0 µl
25 mM MgCl*	0,8 µl
10 mM dNTPs*	0,5 µl
HotStartTaq DNA Polymerase*	0,1 µl
Primerpaar (je 10 nM)	0,5 µl
cDNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung des Mastermix (* = im HotStarTaq Master Mix Kit enthalten)

Durchführung

Der Mastermix wurde bis auf die cDNA angesetzt, und die cDNA wurde, um Kontaminationen zu vermeiden, in einem separaten Raum hinzugegeben. Die PCR wurde wie in Tabelle 10 beschrieben mit 45 Zyklen und bei Single-Cell-PCR mit 50 Zyklen durchgeführt.

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer
Erhitzungs-Phase (Hot-Start Primer)	95°C	15 Minuten
45 Zyklen	Denaturierung (Schmelzen)	94°C 30 Sekunden
	Primerhybridisierung (Anlagerung)	60°C 30 Sekunden
	Elongation (Verlängerung)	72°C 30 Sekunden

Tabelle 10: Ablauf Polymerase-Kettenreaktion

2.7.5 Gelelektrophorese

Dem flüssigen 3%igen-Agarosegel wurden Ethidiumbromid (1 µl pro 100 ml) hinzugefügt und das Gel in die Gelkammer gegossen. Bevor das Gel für 30 Minuten abkühlen konnte, wurden die Kämme eingebracht und so die Probentaschen im Gel während des Aushärtens gebildet. Während des Abkühlens des Gels wurde in jedes Mikroreaktionsgefäß 5 µl Probenauftragspuffer beigemischt. Nachdem das Gel vollständig gehärtet war, wurde das Gelsystem mit TAE-Lösung gefüllt und das Gel mit den PCR-Produkten gefüllt. Sobald die Elektrophorese die Banden weit genug vorangetrieben hat, wurde das Gel aus der Form entnommen und mit Hilfe der Geldokumentation unter UV-Licht fotografiert, digital gespeichert und später ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von TRPA1-Agonisten auf murine Trachealstücke

3.1.1 Wirkung des TRPA1-Agonisten CA auf murine Trachealstücke

Die, wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben, isolierten Trachealstücke wurden im Organbad mit einer Vorspannung von 492 ± 37 mg ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) eingespannt und für 30 Minuten äquilibriert. Nachdem eine CA-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ im Bad erreicht wurde, sank die gemessene Kontraktionskraft ($p = 0,091$; Wilcoxon-Rangsummentest) auf 466 ± 58 mg, was mit einer Bronchodilatation gleichzusetzen ist. Dieser Effekt konnte mit höheren CA-Konzentrationen weiter gesteigert werden. Die gemessene Kontraktionskraft sank dabei signifikant auf 412 ± 56 mg bei einer CA-Konzentration von $500 \mu\text{M}$ und auf 341 ± 84 mg bei einer Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest, jeweils verglichen mit der Baseline; Abbildung 3.1).

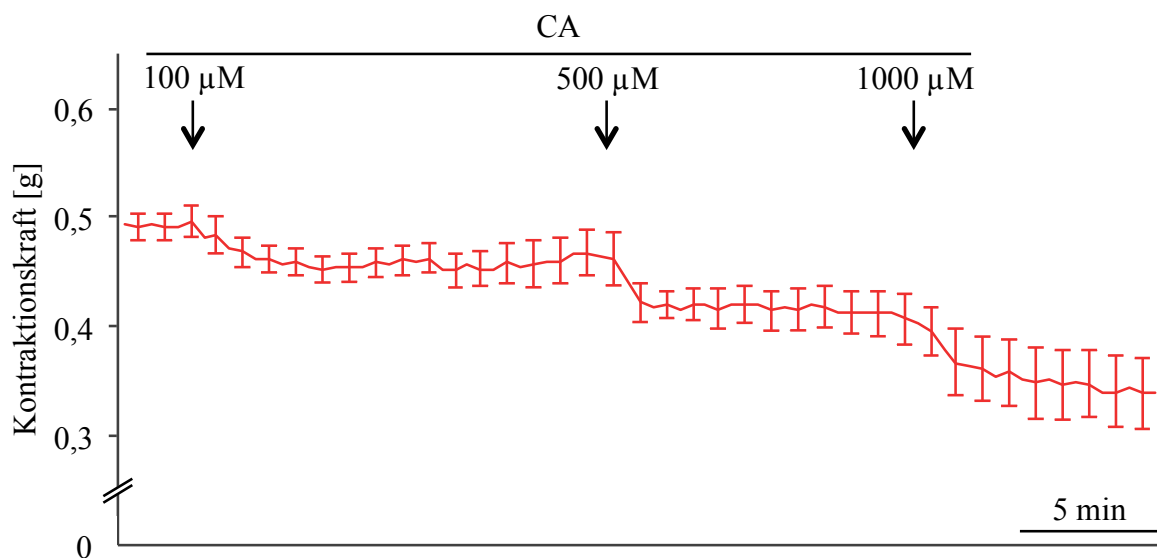


Abbildung 3.1: Kontraktionskraft isolierter Trachealstücke bei aufsteigender Konzentration von Zimtaldehyd (CA) im Organbad. (Mittelwert \pm SEM; $n = 7$)

3.1.2 Wirkung des TRPA1-Agonisten CA auf vorkontrahierte murine Trachealstücke

Anders als erwartet, wurde eine dosisabhängige Bronchodilatation nach der Gabe des TRPA1-Agonisten CA beobachtet (3.1.1). Um zu untersuchen, ob der bronchodilatatorische

Effekt auch an bereits vorkontrahierten Tracheen zu beobachten ist, wurden fünf Trachealstücke entnommen und im Organbad untersucht. Nach der Äquilibrationsphase wurde ein Basalwert von 392 ± 32 mg gemessen, welcher nach dem Hinzufügen von MCH ($100 \mu\text{M}$) signifikant auf 1224 ± 174 mg anstieg ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest). Bei geringen Konzentrationen von CA ($1 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$) konnte keine signifikante bronchodilatatorische Wirkung verglichen mit der maximalen Kontraktionskraft nach MCH-Gabe beobachtet werden. Mit einer CA-Konzentration von $500 \mu\text{M}$ war eine signifikante Relaxation ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) bezogen auf die maximale MCH-induzierte Kontraktionskraft von $69 \pm 4 \%$ (634 ± 56 mg) zu verzeichnen und bei einer Konzentration von 1 mM CA konnte eine vollständige Aufhebung des bronchokonstriktorisches Effekts von MCH beobachtet werden ($108 \pm 4 \%$ [320 ± 18 mg]; $p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest; Abbildung 3.2).

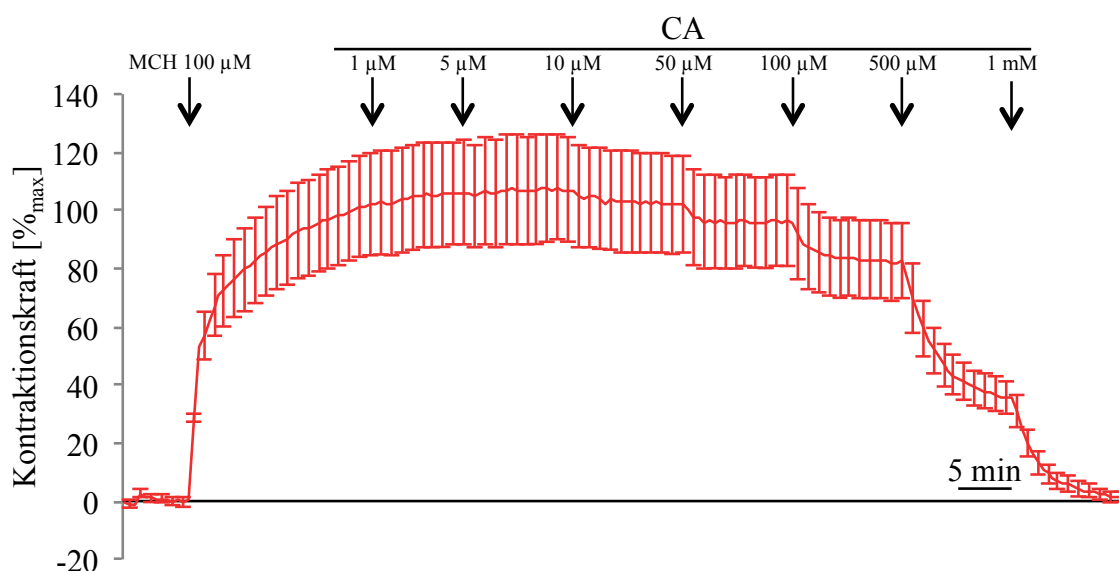


Abbildung 3.2: Wirkung des TRPA1-Agonisten Zimtaldehyd (CA; $1 \mu\text{M}$ - 1 mM ; halb-logarithmische Inkremente) im Organbad auf mit Methacholin (MCH; $100 \mu\text{M}$) vorkontrahierte Trachealstücke (Mittelwert \pm SEM; $n = 5$).

3.1.3 Repetitive Bronchokonstriktion mit MCH und Relaxation mit CA

Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit wurde die CA-vermittelte Bronchodilatation nach MCH-induzierter Bronchokonstriktion nach einem Waschgang wiederholt (Abbildung 3.3). Die Trachealstücke wurden initial auf 289 ± 8 mg vorgespannt. Nach der Gabe von $100 \mu\text{M}$ MCH konnte ein signifikanter Anstieg der Kontraktionskraft auf 960 ± 93 mg ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) gemessen werden. Diese sank auf 844 ± 93 mg ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) nach der Gabe von $650 \mu\text{M}$ CA und weiter auf 346 ± 32 mg ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) nach der Konzentrationserhöhung auf $1250 \mu\text{M}$ CA, jeweils bezogen auf die maximale MCH-induzierte Kontraktionskraft. Danach wurden die Trachealabschnitte mit 500 ml MEM gewaschen. Nach einer erneuten Äquilibrationszeit von 35 Minuten konnte ein Basalwert von 381 ± 57 mg gemessen werden. Nach erneuter Gabe von MCH ($100 \mu\text{M}$) wurde eine Kontraktionskraft von 919 ± 98 mg gemessen, welche auf einen Wert von 754 ± 84 mg nach der Gabe von $650 \mu\text{M}$ CA ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) und auf 433 ± 64 mg nach der Gabe von $1250 \mu\text{M}$ CA ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) absank. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontraktionskraft nach der ersten bzw. zweiten Stimulation mit MCH festgestellt werden ($p > 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die relaxierende Wirkung von CA wiederholt nachweisbar ist, so dass eine Zellschädigung ausgeschlossen werden kann.

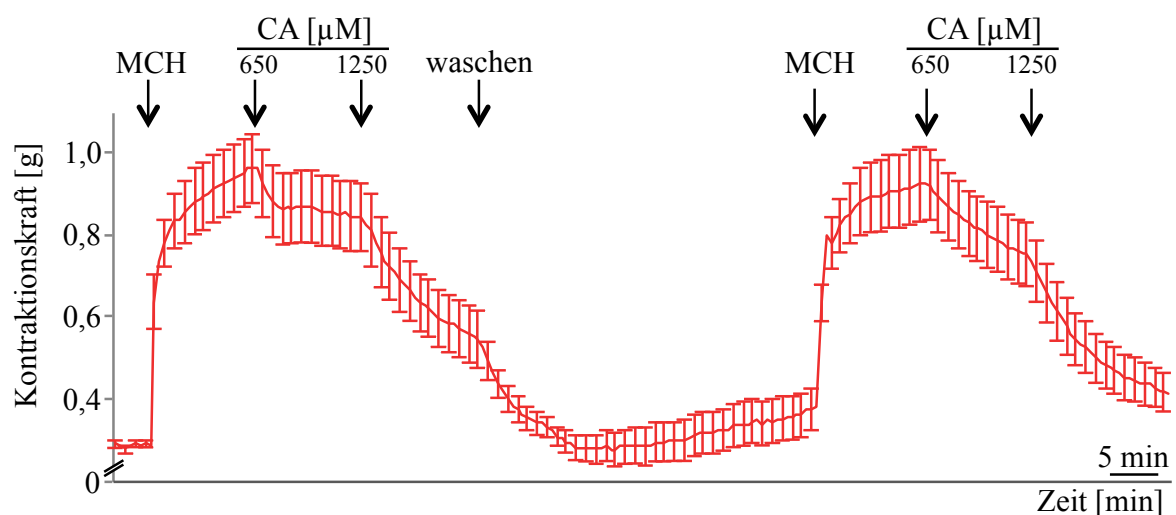


Abbildung 3.3: Wiederholte Methacholin (MCH; $100 \mu\text{M}$)-induzierte Bronchokonstriktion und die anschließende Zimtaldehyd (CA)-induzierte Bronchodilatation (Mittelwert \pm SEM; $n = 6$)

3.1.4 Wirkung elektrophiler und nicht-elektrophiler TRPA1-Agonisten auf vorkontrahierte Trachealstücke

Um die elektrophile Eigenschaft von CA als Ursache für den beobachteten bronchodilatatorischen Effekt auszuschließen, sollte nachfolgend die Wirkung von nicht-elektrophilen TRPA1-Agonisten (Carvacrol, 2-APB, Thymol) getestet werden sowie die Wirkung weiterer elektrophiler TRPA1-Agonisten wie Acrolein und AITC untersucht werden. Damit sollte getestet werden, ob die bronchodilatatorische Wirkung von CA auf die elektrophile Eigenschaft dieser Substanz zurückzuführen ist.

Alle in diesem Versuchsabschnitt verwendeten, nicht-elektrophilen Substanzen zeigten ebenfalls eine dosisabhängige bronchodilatatorische Wirkung an vorkontrahierten Trachealstücken, wie diese auch mit CA beobachtet wurde (Abbildung 3.4). Verglichen mit CA konnte sowohl bei Carvacrol als auch bei 2-APB mit allen Konzentrationen eine stärkere Relaxation beobachtet werden. Ähnlich wie bei CA konnte jedoch bei den nicht-elektrophilen Substanzen kein Effekt bei Konzentrationen kleiner als 10 μM beobachtet werden. Bei einer Agonisten-Konzentration von 10 μM erreichte 2-APB eine signifikante Relaxation von $17 \pm 3 \%$ ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest), hingegen konnte bei Carvacrol und Thymol noch kein signifikanter Effekt beobachtet werden ($1 \pm 9 \%$ bzw. $3 \pm 2 \%$; $p > 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest). Bei einer Konzentration von 50 μM konnte bei 2-APB eine signifikante Relaxation von $61 \pm 6 \%$ ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) und mit Carvacrol und Thymol keine signifikante Relaxation von $20 \pm 8 \%$ bzw. $10 \pm 3 \%$ ($p > 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest), jeweils auf die maximale MCH-induzierte Konstriktion bezogen, beobachtet werden. 2-APB bewirkte bei einer Agonisten-Konzentration von 100 μM eine Relaxation von $81 \pm 6 \%$ ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) und bei 500 μM eine beinahe vollständige Aufhebung des bronchokonstriktorischen Effekts von MCH ($98 \pm 5 \%$; $p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest). Bei einer 2-APB-Konzentration von 1 mM wurde eine Relaxation von $88 \pm 4 \%$ ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) beobachtet. Carvacrol konnte die bronchokonstriktorische Wirkung von MCH bei einer Konzentration von 100 μM nur etwa zur Hälfte ($45 \pm 11 \%$) und Thymol nur zu einem Drittel ($34 \pm 4 \%$; beide $p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) aufheben. Bei den beiden höheren Konzentrationen wurde der bronchokonstriktorische Effekt von MCH von Carvacrol (500 μM : $137 \pm 14 \%$; 1 mM: $126 \pm 14 \%$; beide $p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) und Thymol (500 μM : $109 \pm 3 \%$; 1 mM: $105 \pm 3 \%$; beide $p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest) jedoch mehr als kompensiert. Auffällig bei allen Antagonisten war die Beobachtung, dass die Relaxation bei höheren Agonisten-Konzentrationen bei allen Agonisten wieder abnahm, jedoch diese Abnahme nur

für Carvacrol und 2-APB signifikant war (beide $p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest; Abbildung 3.4).

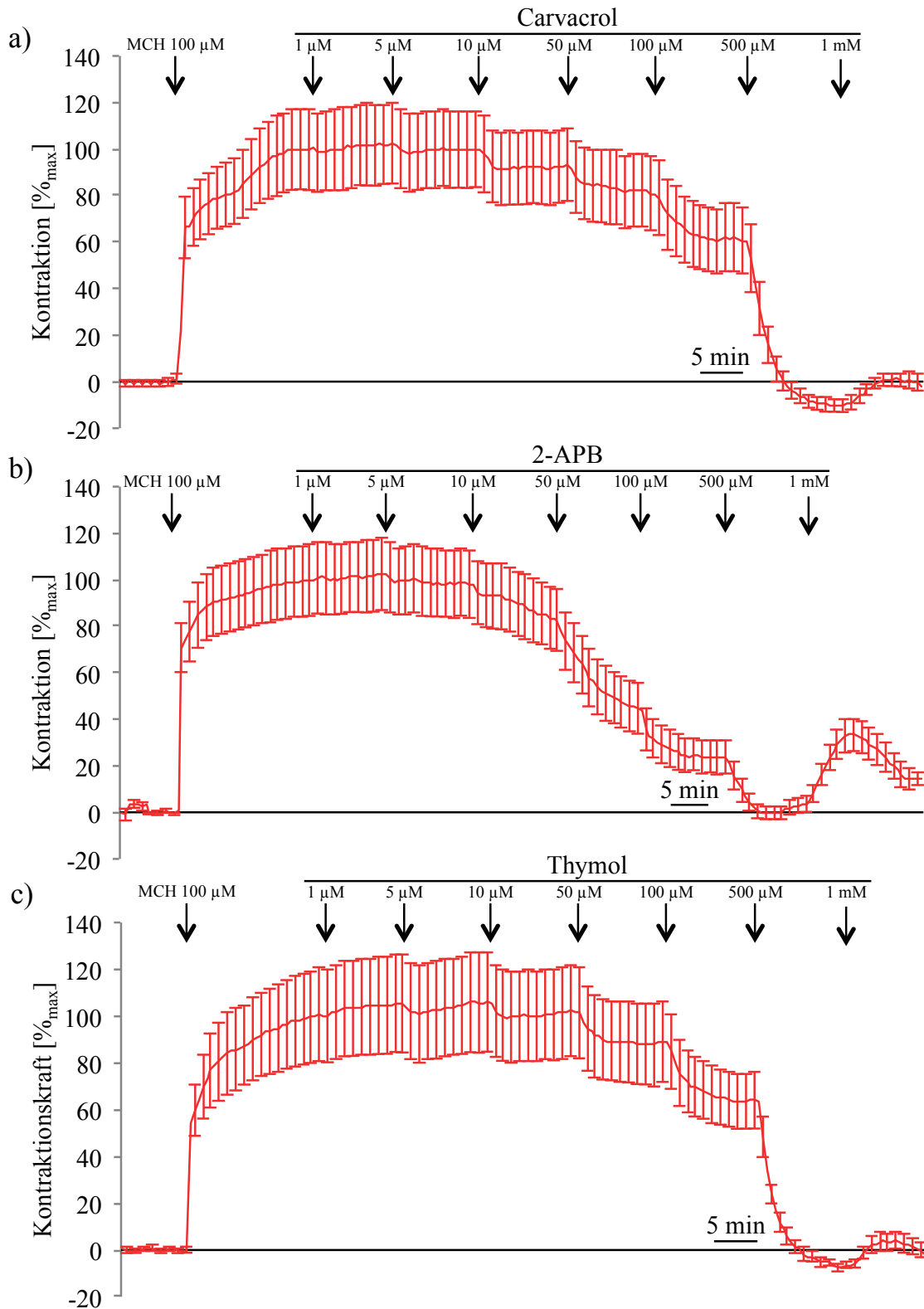


Abbildung 3.4: Die Abbildung zeigt die dosisabhängige Bronchodilatation der nicht-elektrophilen TRPA1-Agonisten Carvacrol (a), 2-Aminoethyldiphenylborate (2-APB, b) und Thymol (c) bei mit Methacholin (MCH; 100 µM) vorkontrahierten Trachealstücken im zeitlichen Verlauf. (Mittelwert \pm SEM; beide $n = 6$)

Auch bei den untersuchten elektrophilen Agonisten gab es zum Teil deutliche Unterschiede in der bronchodilatatorischen Wirkung. Bei einer TRPA1-Agonisten-Konzentration von 1 μM und 5 μM konnte auch hier keine bronchodilatatorische Wirkung beobachtet werden, mit der Ausnahme von Acrolein. Selbst bei einer Acrolein-Konzentration von 5 μM konnte eine signifikante Relaxation von $14 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest), verglichen mit der maximalen MCH-induzierten Bronchokonstriktion, beobachtet werden. Bei einer Acrolein-Konzentration von 10 μM betrug die Relaxation bereits $35 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest). Im Vergleich dazu bewirkte AITC keine signifikante bronchodilatatorische Wirkung bei einer Konzentration von 10 μM ($4 \pm 4 \%$). Zwischen einer Konzentration von 50 μM und 500 μM konnte bei allen beiden Agonisten eine dosisabhängige Zunahme der Bronchodilatation beobachtet werden. Bei einer Agonisten-Konzentration von 50 μM bewirkte Acrolein mit $49 \pm 5 \%$ eine signifikant ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) stärkere Relaxation als AITC ($24 \pm 5 \%$). Sowohl bei einer Konzentration von 100 μM als auch bei einer Konzentration von 500 μM führte Acrolein mit $73 \pm 4 \%$ bzw. $96 \pm 3 \%$ zu einer signifikant stärkeren Relaxation verglichen mit AITC ($51 \pm 6 \%$ bzw. $68 \pm 5 \%$; alle $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Anders als AITC ($78 \pm 5 \%$) konnte bei einer Konzentration von 1 mM Acrolein ($98 \pm 5 \%$) die MCH-abhängige Bronchokonstriktion vollständig aufheben (Abbildung 3.5). Der bronchodilatatorische Effekt von Acrolein bei einer Konzentration von 1 mM war somit signifikant höher als jener von AITC ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Die prozentualen Werte der bronchodilatatorischen Wirkung der TRPA1-Agonisten ausgehend von der maximalen Bronchokonstriktion durch 100 μM MCH sind in Tabelle 11 zusammengefasst und in Abbildung 3.6 grafisch dargestellt.

TRPA1-Agonist	Konzentration des Agonisten				
	10 μM	50 μM	100 μM	500 μM	1000 μM
Acrolein (n = 7)	$35 \pm 5 \%$	$49 \pm 5 \%$	$73 \pm 4 \%$	$96 \pm 3 \%$	$98 \pm 5 \%$
AITC (n = 6)	$4 \pm 4 \%$	$24 \pm 5 \%$	$51 \pm 6 \%$	$68 \pm 5 \%$	$78 \pm 5 \%$
CA (n = 5)	$-5 \pm 3 \%$	$0 \pm 4 \%$	$15 \pm 4 \%$	$69 \pm 4 \%$	$108 \pm 4 \%$
Thymol (n = 7)	$3 \pm 2 \%$	$10 \pm 3 \%$	$34 \pm 4 \%$	$109 \pm 3 \%$	$105 \pm 3 \%$
2-APB (n = 6)	$17 \pm 3 \%$	$61 \pm 6 \%$	$81 \pm 6 \%$	$98 \pm 5 \%$	$88 \pm 4 \%$
Carvacrol (n = 6)	$1 \pm 9 \%$	$20 \pm 8 \%$	$45 \pm 11 \%$	$137 \pm 14 \%$	$126 \pm 14 \%$

Tabelle 11: Dosisabhängige bronchodilatatorische Wirkung ausgehend von der maximalen MCH-induzierten Bronchokonstriktion unterschiedlicher elektrophiler (Acrolein; Allylthiocyanat, AITC; Zimtaldehyd, CA) und nicht-elektrophiler (Thymol; Carvacrol; 2-Aminoethyldiphenylborate, 2-APB) TRPA1-Agonisten. (Mittelwert \pm SEM)

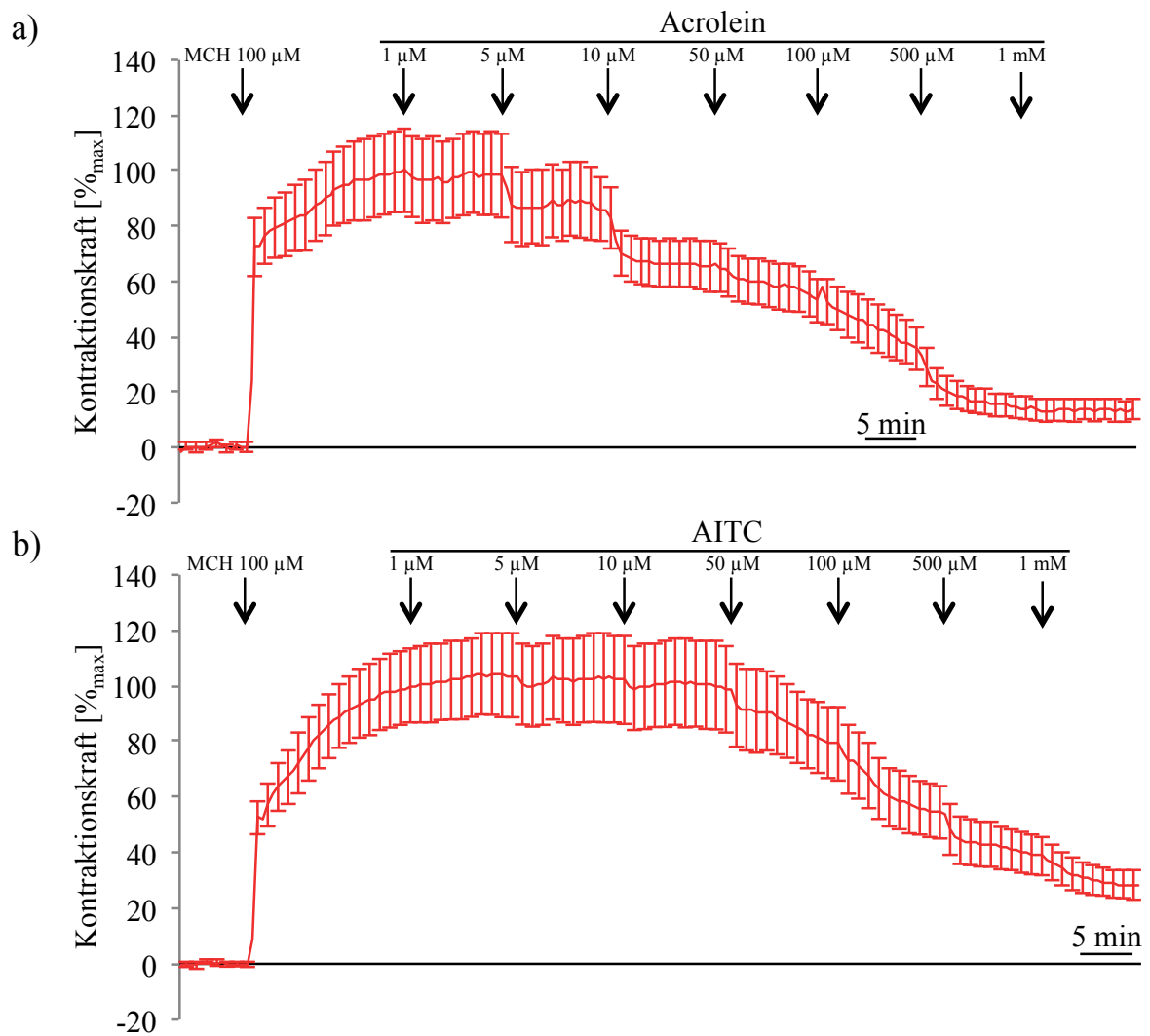


Abbildung 3.5: Dargestellt ist die durch die elektrophilen TRPA1-Agonisten Acrolein (a) und Allylisothiocyanat (AITC, b) dosisabhängig hervorgerufene Bronchodilatation bei mit Methacholin (MCH; 100 μ M) vorkontrahierten Trachealstücken im zeitlichen Verlauf. (Mittelwert \pm SEM; n = 6-7 pro Agonist)

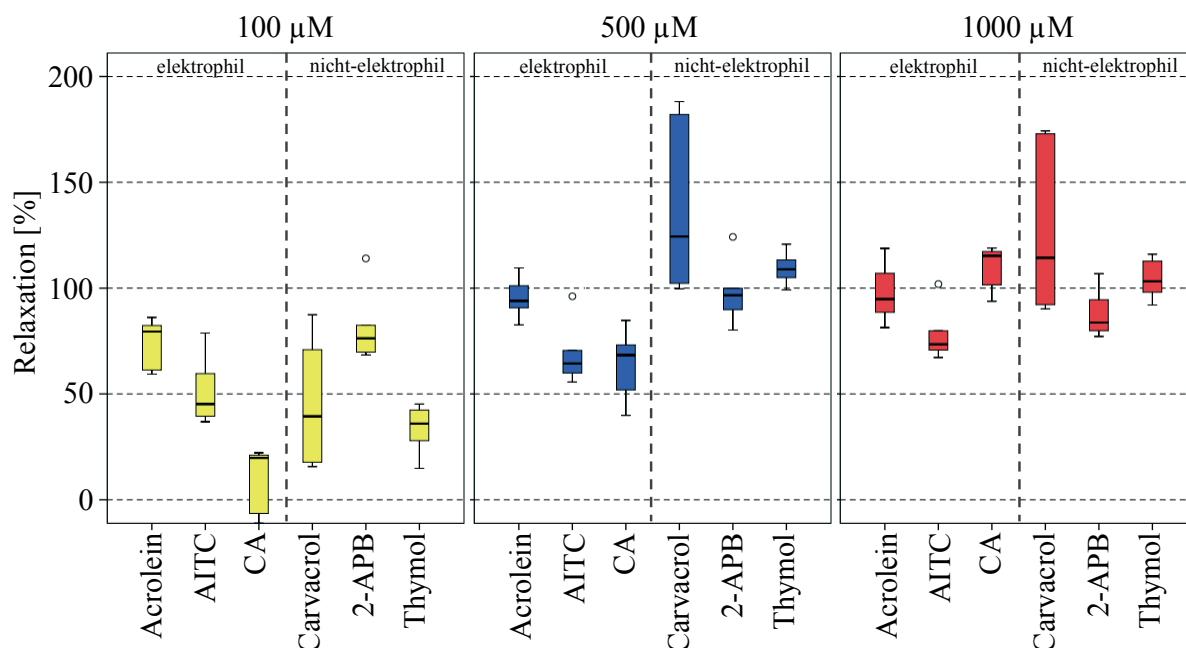


Abbildung 3.6: Vergleichende Darstellung der Effektivität der bronchodilatatorischen Wirkung der elektrophilen (Acrolein; Allylisothiocyanat, AITC; Zimtaldehyd, CA) und nicht-elektrophilen (Carvacrol; 2-Aminoethyldiphenylborate, 2-APB; Thymol) TRPA1-Agonisten bei einer Konzentration von 100 µM (gelb), 500 µM (blau) und 1000 µM (rot) (n = 6-7 pro Agonist).

Zusammenfassend konnte in diesem Versuchsteil gezeigt werden, dass CA sowohl auf unbehandelte Trachealstücke der Maus als auch auf vorkontrahierte Trachealstücke eine bronchodilatatorische Wirkung besitzt. Dieser Effekt ist, wie in Abschnitt 3.1.3 gezeigt wurde, wiederholt zu beobachten und somit nicht aufgrund eines toxischen Geschehens bedingt. Die bronchodilatatorische Wirkung konnte neben CA noch bei weiteren elektrophilen und nicht-elektrophilen TRPA1-Agonisten gezeigt werden, womit eine Beteiligung des TRPA1-Rezeptors am bronchodilatatorischen Effekt naheliegend ist. Gleichzeitig ist der beobachtete bronchodilatatorische Effekt unabhängig von zentralnervalen Reflexen. Die exakte Rolle von TRPA1 soll im nachfolgenden Versuchsabschnitt untersucht werden.

3.2 Rolle von TRPA1 bei der bronchodilatatorischen Wirkung von CA

Die Ausgangshypothese, dass TRPA1-Agonisten eine Bronchokonstriktion auf murine Trachealstücke bewirken, wurde durch die in Kapitel 3.1.1 durchgeführten Versuche falsifiziert. Entgegen der Erwartungen bewirkte CA eine dosisabhängige Bronchodilatation sowohl auf unbehandelte Trachealstücke als auch auf mit MCH vorkontrahierte Trachealstücke. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auf die elektrophile Eigenschaft einzelner TRPA1-Agonisten zurückzuführen ist, da sowohl elektrophile als auch nicht-elektrophile TRPA1-Agonisten eine bronchodilatatorische Wirkung aufweisen. Damit ist naheliegend, dass der bronchodilatatorische Effekt TRPA1-Rezeptor vermittelt ist. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der Einfluss von TRPA1-Rezeptorblockern (HC-030031, AP-18, Ruthenium Red) auf die bronchodilatatorische Wirkung des TRPA1-Agonisten CA getestet.

3.2.1 Funktionskontrolle des TRPA1-Blockers HC-030031 mittels Kalziumimaging

Die selektive Wirkung des TRPA1-Blockers HC-030031 wurde bereits eingehend beschrieben (EID et al., 2008) und wurde hier für die verwendete Charge des Blockers mittels Kalziumimaging untersucht. Dazu wurden in drei unabhängigen Versuchen Spinalganglien von insgesamt drei Mäusen, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, dissoziiert und auf insgesamt 24 Deckgläschen ausgesät (8 Deckgläschen an jedem Versuchstag). Diese wurden in zwei gleichgroße Gruppen unterteilt und nach dem in Punkt 2.6.2 beschriebenen Protokoll untersucht.

In der Kontrollzellgruppe reagierten insgesamt 466 Zellen auf Capsaicin. Von diesen 466 Zellen zeigten 37 Zellen (7,9 %) eine positive Reaktion auf CA (Abbildung 3.7).

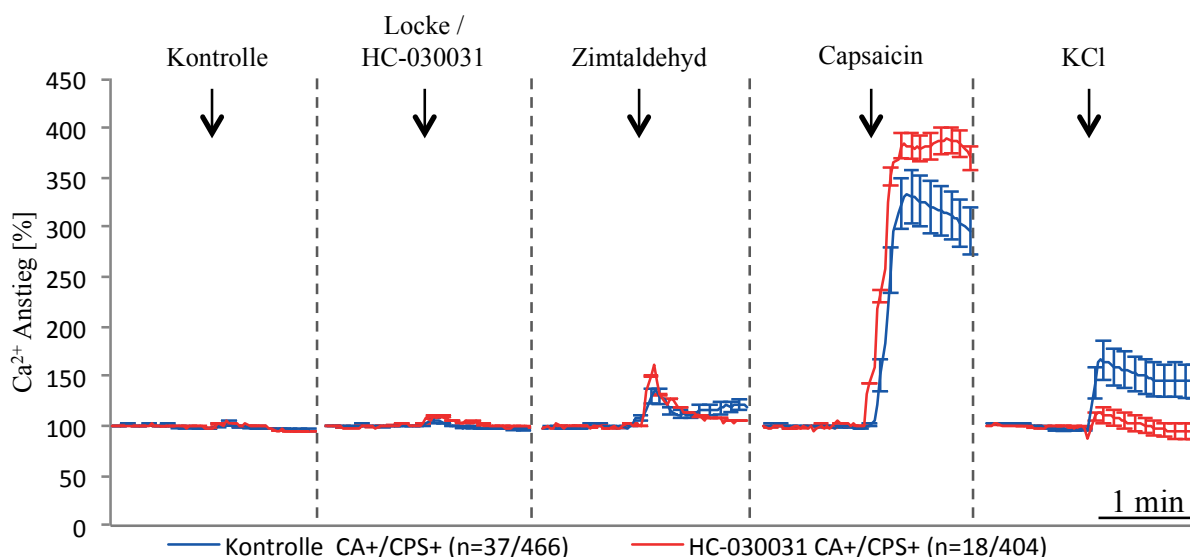


Abbildung 3.7: Die Grafik zeigt die auf Zimtaldehyd (CA) reagierenden Zellen der Kontrollgruppe (blau) und die auf CA reagierenden Zellen aus der Gruppe mit dem Blocker (rot) im zeitlichen Versuchsablauf. Insgesamt reagierten in der Kontrollgruppe 37 der 466 Capsaicin-positiven Zellen (CPS+) auch positiv auf CA und in der Gruppe mit Blocker 18 von 404 Zellen. KCl, Kaliumchlorid; Ca^{2+} , Kalzium.

Bei den Zellen, die mit dem selektiven TRPA1-Blocker HC-030031 (20 μM) behandelt wurden, waren insgesamt 404 Zellen Capsaicin-positiv, wovon 18 Zellen (4,5 %) auch auf die Stimulation mit dem TRPA1-Agonisten CA reagierten (Abbildung 3.7). Somit ist der Anteil der CA-positiven Zellen in der Kontrollgruppe signifikant höher ($p = 0,035$; χ^2 -Vierfeldertests). Ein Unterschied in der maximalen Reaktion (Δ_{max}) auf die Stimulation mit CA konnte zwischen den beiden Gruppen nicht festgestellt werden ($p = 0,203$; Mann-Whitney-U-Test).

3.2.2 Einfluss von TRPA1-Blockern auf die CA-vermittelte Bronchodilatation

HC-030031 und AP-18 sind selektive TRPA1-Rezeptorblocker, wohingegen Ruthenium Red neben TRPA1 noch andere TRP-Kanäle inhibiert. In diesem Versuchsabschnitt soll der Einfluss dieser TRPA1-Blocker auf die in Abschnitt 3.1 beobachtete bronchodilatatorische Wirkung untersucht werden.

Nicht-selektiver TRPA1-Blocker Ruthenium Red

Neben den TRPA1-Rezeptoren werden durch diesen unspezifischen Blocker auch andere TRP-Rezeptoren, nämlich die Vertreter der Vanilloid-Gruppe (TRPV1, TRPV2, TRPV3) gehemmt. Die auf 338 ± 12 mg vorgespannten Trachealstücke kontrahierten innerhalb von 15 Minuten nach MCH-Gabe (100 μM) signifikant auf maximal 1255 ± 87 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). 10 Minuten nach Gabe von 650 μM CA verringerte sich die

Kontraktionskraft, verglichen mit der maximalen MCH-induzierten Kontraktionskraft, signifikant auf 876 ± 30 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Umgerechnet ergab dies eine Relaxation um 46 ± 3 %. Nachdem die CA-Konzentration im Organbad auf $1250 \mu\text{M}$ gesteigert wurde, erreichte die Kontraktionskraft nach weiteren 10 Minuten einen Wert von 373 ± 17 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) oder, anders ausgedrückt, eine vollständige Relaxation der MCH-induzierten Konstriktion (96 ± 3 %; Abbildung 3.8). Verglichen mit der Kontrollgruppe war die CA-vermittelte Bronchodilatation in Anwesenheit von Ruthenium Red sowohl bei einer CA-Konzentration von $650 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test) als auch bei einer CA-Konzentration von $1250 \mu\text{M}$ signifikant höher (beide $p = 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.10).

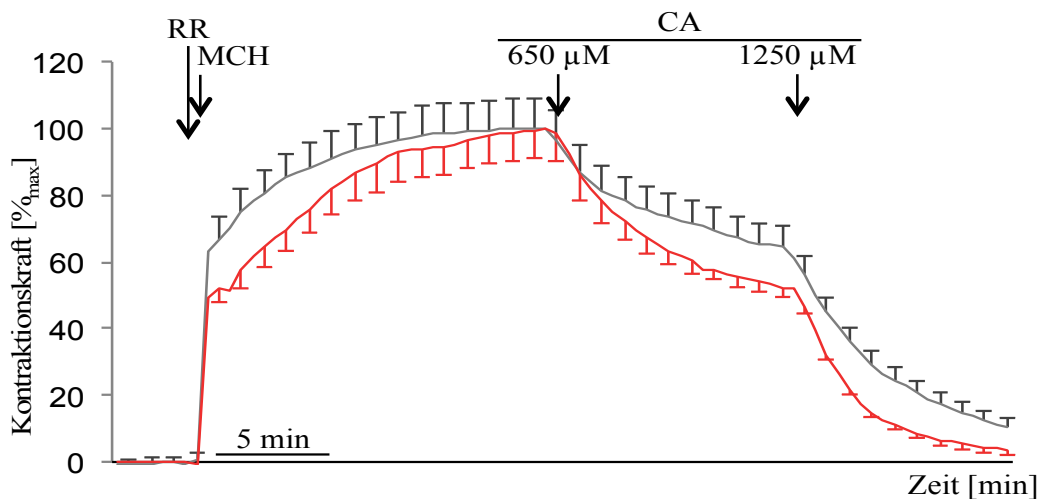


Abbildung 3.8: Dargestellt sind der Mittelwert und der SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-assoziierten Relaxation nach Methacholingabe (MCH; $100 \mu\text{M}$) mit (rot; $n = 6$) und ohne (grau; $n = 16$) Behandlung mit Ruthenium Red (RR; $30 \mu\text{M}$) im zeitlichen Verlauf.

Selektive TRPA1-Blocker HC-030031 und AP-18

Die Trachealstücke wurden wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben für mindestens 30 Minuten äquilibriert und anschließend auf Vorspannung gebracht. Die Vorspannung für die Gruppe mit dem Blocker HC-030031 ($100 \mu\text{M}$; $n = 6$) betrug im Mittel 273 ± 10 mg und mit dem Blocker AP-18 ($30 \mu\text{M}$; $n = 7$) 291 ± 10 mg. Eine halbe Minute nach dem jeweiligen Blocker wurde MCH ($100 \mu\text{M}$) dem Organbad hinzugefügt. Nach 15 Minuten konnte in der Gruppe mit dem Blocker HC-030031 eine maximale Kontraktion von 729 ± 94 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) und in der Gruppe mit AP-18 als Blocker eine maximale Kontraktion von 938 ± 65 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) gemessen werden. Nachdem dem Organbad $650 \mu\text{M}$ CA hinzugefügt wurde, sank die Kontraktionskraft nach 10 Minuten signifikant auf 437 ± 47 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) in der Gruppe

mit HC-030031 als Blocker bzw. auf 516 ± 42 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) in der Gruppe mit AP-18 als Blocker. Dies entsprach einer Relaxation von 67 ± 5 % (HC-030031) bzw. 65 ± 5 % (AP-18) bezogen auf die maximale MCH-induzierte Bronchokonstriktion. Nach Erhöhung der CA-Konzentration auf $1250 \mu\text{M}$ sank die Kontraktionskraft in beiden Gruppen signifikant weiter und erreichte nach 10 Minuten einen Wert von 249 ± 23 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) in der HC-030031-Gruppe bzw. 253 ± 18 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) in der AP-18-Gruppe. Umgerechnet in Prozent ergab sich eine Relaxation von 101 ± 3 % (HC-030031) bzw. 107 ± 3 % (AP-18), was einer vollständigen Aufhebung der MCH-induzierten Bronchokonstriktion entspricht (Abbildung 3.9). Der Unterschied zwischen dem prozentualen Wert der Relaxation von HC-030031 verglichen mit dem prozentualen Wert der Relaxation von AP-18 ist weder bei einer CA-Konzentration von $650 \mu\text{M}$ noch bei einer CA-Konzentration von $1250 \mu\text{M}$ signifikant unterschiedlich ($p = 0,836$ bzw. $p = 1,00$; Mann-Whitney-U-Test).

Vergleicht man diese Werte mit den Werten der Kontrollgruppe, die bei einer CA-Konzentration von $650 \mu\text{M}$ eine Relaxation von 34 ± 3 % und bei einer CA-Konzentration von $1250 \mu\text{M}$ eine Relaxation von 86 ± 4 % bewirkte, so ist der Unterschied für beide TRPA1-Blocker bei beiden CA-Konzentrationen signifikant ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.10). Interessanterweise führt die Blockade von TRPA1 zu einer verstärkten Dilatation gegenüber der Kontrolle durch den TRPA1-Agonisten CA.

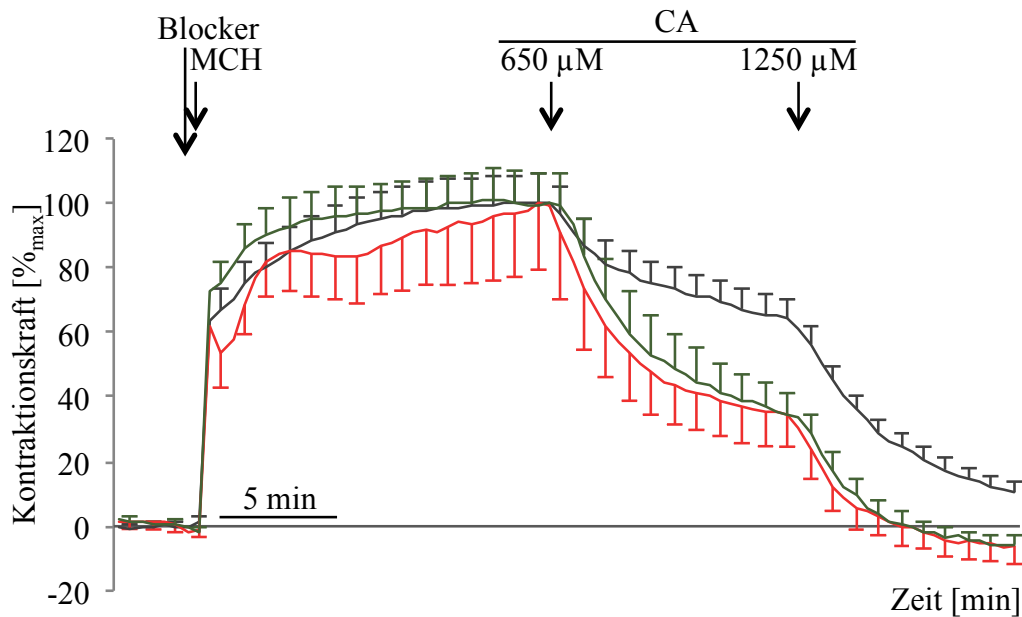


Abbildung 3.9: Einfluss der selektiven TRPA1-Blocker HC-030031 (100 μM ; rot; $n = 6$) und AP-18 (30 μM ; grün; $n = 7$) auf die Zimtaldehyd (CA)-vermittelte Bronchodilatation verglichen mit der Kontrollgruppe (grau; $n = 16$) nach Methacholingabe (MCH; 100 μM). Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion ($\%_{\text{max}}$).

TRPA1-Knockout-Mäuse

In den vorangegangenen Versuchen zeigte sich, dass sowohl selektive als auch nicht-selektive TRPA1-Blocker die bronchodilatatorische Wirkung von CA steigern konnten. Um dieses unerwartete Ergebnis weiter zu untersuchen, wurden Trachealstücke von 7 TRPA1-defizienten Mäusen untersucht. Nach der Äquilibrationszeit wurden die Tracheen auf eine Vorspannung von 297 ± 19 mg gebracht. Die MCH-induzierte Bronchokonstriktion erreichte nach 15 Minuten eine maximale Konstriktionskraft von 1222 ± 72 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Diese sank nach Zugabe von 650 μM CA signifikant um 79 ± 8 % verglichen mit der maximalen MCH-induzierten Kontraktionskraft auf einen Wert von 520 ± 8 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Nach der Erhöhung der Gesamtkonzentration von CA auf 1250 μM konnte ein weiterer signifikanter Abfall der Konstriktionskraft auf 236 ± 10 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) beobachtet werden. Dies entsprach einer vollständigen Aufhebung der MCH-induzierten Bronchokonstriktion (108 ± 4 %). Somit konnte auch bei TRPA1-Knockout-Mäusen bei beiden CA-Konzentrationen eine signifikant höhere CA-induzierte Bronchodilatation im Vergleich zur Wildtyp-Maus beobachtet werden ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.10).

Vergleichende Gegenüberstellung der Relaxation

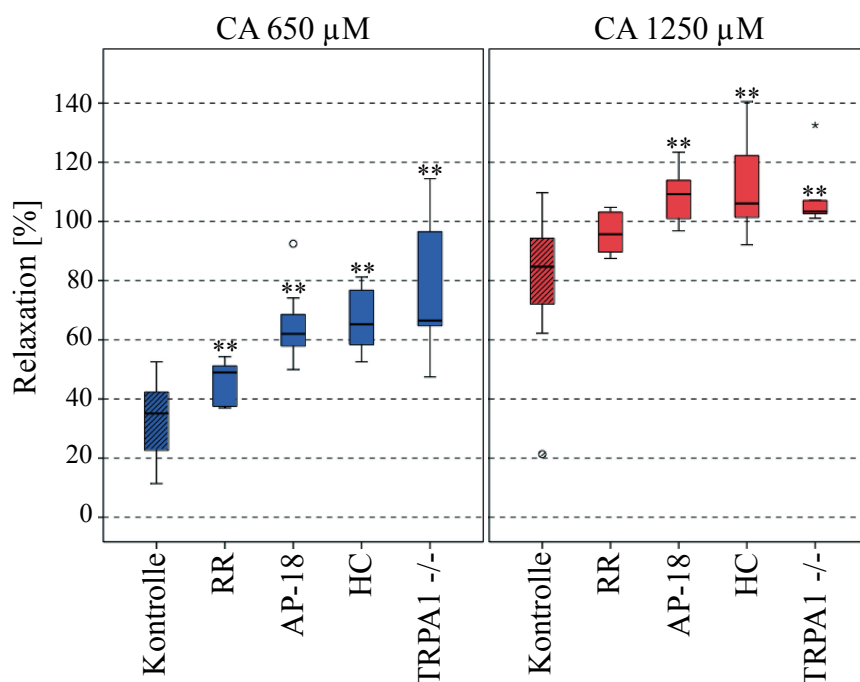


Abbildung 3.10: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von Trachealstücken mit HC-030031 (HC; 100 µM), AP-18 (30 µM) und Ruthenium Red (RR; 30 µM) als Blocker sowie Trachealstücke aus TRPA1-Knockout-Mäusen (TRPA1 -/-) verglichen mit der Kontrolle bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 µM [blau] und 1250 µM [rot]). Sowohl bei einer CA-Konzentration von 650 µM als auch bei einer CA-Konzentration von 1250 µM war der Unterschied zwischen der Kontrolle und den Blockern signifikant (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test; $n = 6-16$). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass der bronchodilatatorische Effekt von CA nicht durch den TRPA1-Rezeptor vermittelt ist. Vielmehr lassen die Versuche mit den TRPA1-Blockern und Knockout-Mäusen darauf schließen, dass TRPA1-Rezeptoren bei Aktivierung eine Bronchokonstriktion vermitteln. In den Atemwegen ist TRPA1 hauptsächlich in C-Faser-Neuronen, aber auch in anderen Zelltypen exprimiert, wie in Punkt 1.3.1.1 diskutiert. Der Einfluss der neuronal exprimierten TRPA1-Rezeptoren wurde im nächsten Versuchsteil mit Hilfe von organotypischen Kulturen untersucht.

3.2.3 Rolle der atemwegsinnervierenden C-Faser-Neurone bei der Wirkung des TRPA1-Agonisten CA

TRPA1 ist in den meisten atemwegsinnervierenden C-Faser-Neuronen exprimiert. Bei der Entnahme der Trachea werden diese Axone von ihren Zellkörpern getrennt, was eine Wallersche-Degeneration dieser Axone bewirkt. Diese Degeneration dauert jedoch einige

Tage. Aus diesem Grund wurden insgesamt 11 Trachealstücke nach der Entnahme für fünf Tage in MEM bei 37°C inkubiert und anschließend die Organbadversuche durchgeführt (Abbildung 3.11). Die Trachealstücke wurden mit einer Vorspannung 329 ± 20 mg von für mindestens 30 Minuten äquiliibriert. 15 Minuten nach der MCH-Gabe konnte eine maximale Kontraktionskraft von 613 ± 34 mg ($p < 0,01$; Wilcoxon-Rangsummentest) beobachtet werden. Die deutlich geringere maximale Kontraktionskraft im Vergleich zur Kontrollgruppe ist durch die lange Inkubation der Trachealabschnitte zu erklären. Die Kontraktion verringerte sich, verglichen mit der maximalen MCH-induzierten Konstriktion, signifikant bei einer CA-Konzentration von $650 \mu\text{M}$ auf 434 ± 33 mg (62 ± 10 %; $p < 0,01$; Wilcoxon-Rangsummentest) und sank bei einer CA-Konzentration von $1250 \mu\text{M}$ auf 218 ± 19 mg (138 ± 1 %; $p < 0,01$; Wilcoxon-Rangsummentest) ab.

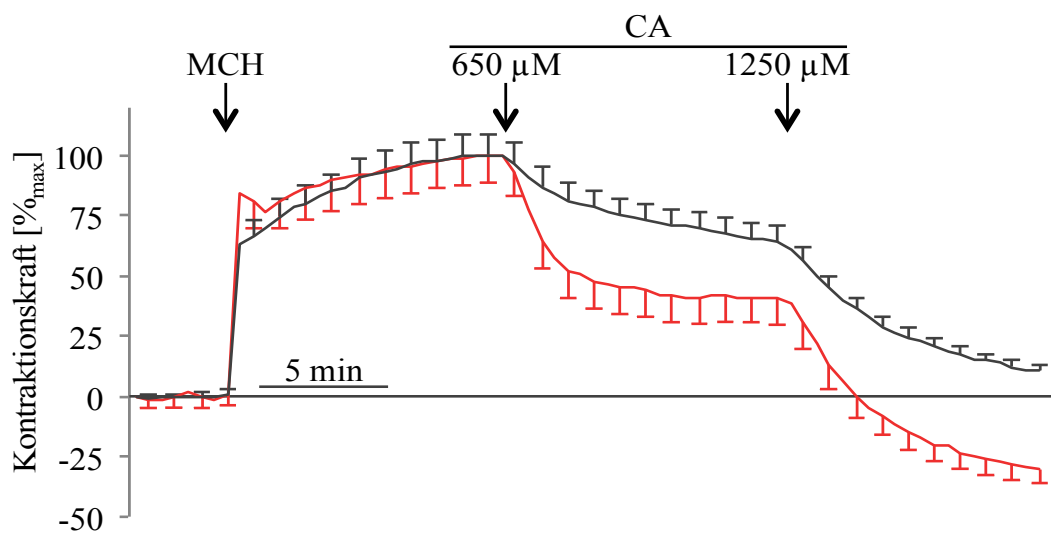


Abbildung 3.11: Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-vermittelten Bronchodilatation nach Methacholingabe (MCH; $100 \mu\text{M}$) von inkubierten Trachealstücken (rot; $n = 11$) verglichen mit der Kontrollgruppe (grau; $n = 16$) im zeitlichen Verlauf.

Verglichen mit der Kontrollgruppe war die bronchodilatatorische Wirkung bei den inkubierten Trachealstücken sowohl bei einer CA-Konzentration von $650 \mu\text{M}$ als auch bei einer CA-Konzentration von $1250 \mu\text{M}$ signifikant höher ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.12).

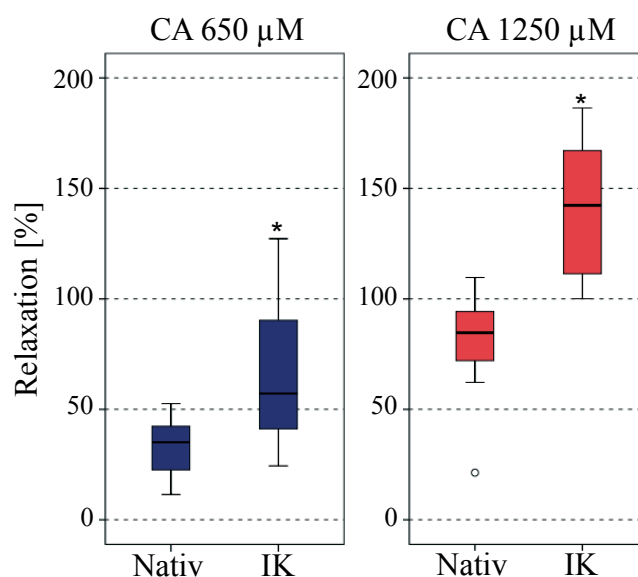


Abbildung 3.12: Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von nicht inkubierten Trachealstücken (Nativ) und inkubierten Trachealstücken (IK) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 µM [blau] und 1250 µM [rot]). Sowohl für eine Konzentration von CA von 650 µM ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test) als auch für die Konzentration von 1250 µM ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test) ist der Unterschied signifikant. Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

Auch in diesem Versuch konnte ein signifikant höherer dilatatorischer Effekt von CA als bei der Kontrollgruppe beobachtet werden. Um sicherzustellen, dass die organotypische Kultur auch effektiv war, das heißt, die Axone der C-Faser-Neurone degeneriert waren, wurden jeweils vier Trachealstücke nach dem Organbadversuch fixiert und auf CGRP-immunreaktive Fasern untersucht.

Die mechanische Beanspruchung der Trachealstücke durch die Aufhängung im Organbad war sowohl in den nativen Trachealschnitten (Abbildung 3.13, D) als auch in den inkubierten Trachealschnitten (Abbildung 3.13, A) deutlich sichtbar. So zeigten sich im mikroskopischen Bild stellenweise Ablösungen der Mukosa und der Lamina propria von der Tunica fibro-musculo-cartilaginea und somit Zwischenräume. Der Zustand der inkubierten Trachealschnitte stellte sich dabei deutlich schlechter da als jener der nicht-inkubierten Trachealschnitte. Die Immunfluoreszenz mit dem CGRP-Antikörper zeigte bei den nativen Trachealstücke CGRP-immunreaktive Nervenfasern im Bereich der Tunica adventitia, welche auch bei kleiner Vergrößerung gut sichtbar waren (Abbildung 3.13, D). Bei zunehmender Vergrößerung konnten auch angefärbte subepitheliale Nervenfasern detektiert werden (Abbildung 3.13, E). Auch einzelne Epithelzellen waren CGRP-immunreaktiv

(Abbildung 3.13, D, Pfeil). Dabei handelt es sich um neuroendokrine Zellen, welche ebenfalls CGRP exprimieren.

Im Vergleich zu den nativen Trachealschnitten konnte bei den inkubierten Trachealstücken eine deutliche Reduktion der CGRP-Immunreaktivität festgestellt werden, wobei vor allem bei kleinerer Vergrößerung die Verminderung der immunreaktiven Nervenfasern in der Tunica adventitia auffiel. Dieser Befund bestätigte sich bei zunehmender Vergrößerung (Abbildung 3.13, B). Die im nativen Präparat beobachteten subepithelialen CGRP-positiven Nervenfasern konnten vereinzelt auch bei den inkubierten Trachealschnitten nachgewiesen werden, wobei diese subjektiv betrachtet in einer geringeren Anzahl vorhanden waren. Wie im nativen Präparat waren auch nach Inkubation vereinzelt neuroendokrine Zellen im Epithel zu beobachten (in Abbildung 3.13 nicht zu sehen). In der Negativkontrolle (ohne CGRP-Antikörper) konnte keine Immunreaktion beobachtet werden, was eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers ausschließen lässt. Zusammenfassend war eine deutliche Reduktion der CGRP-Immunreaktion bei den inkubierten Trachealstücken (Abbildung 3.13, Bildpaar A, B) verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 3.13, Bilder D und E) sowohl im Bereich der Tunica adventitia als auch bei den epithelial gelegenen Nervenendendigungen zu beobachten.

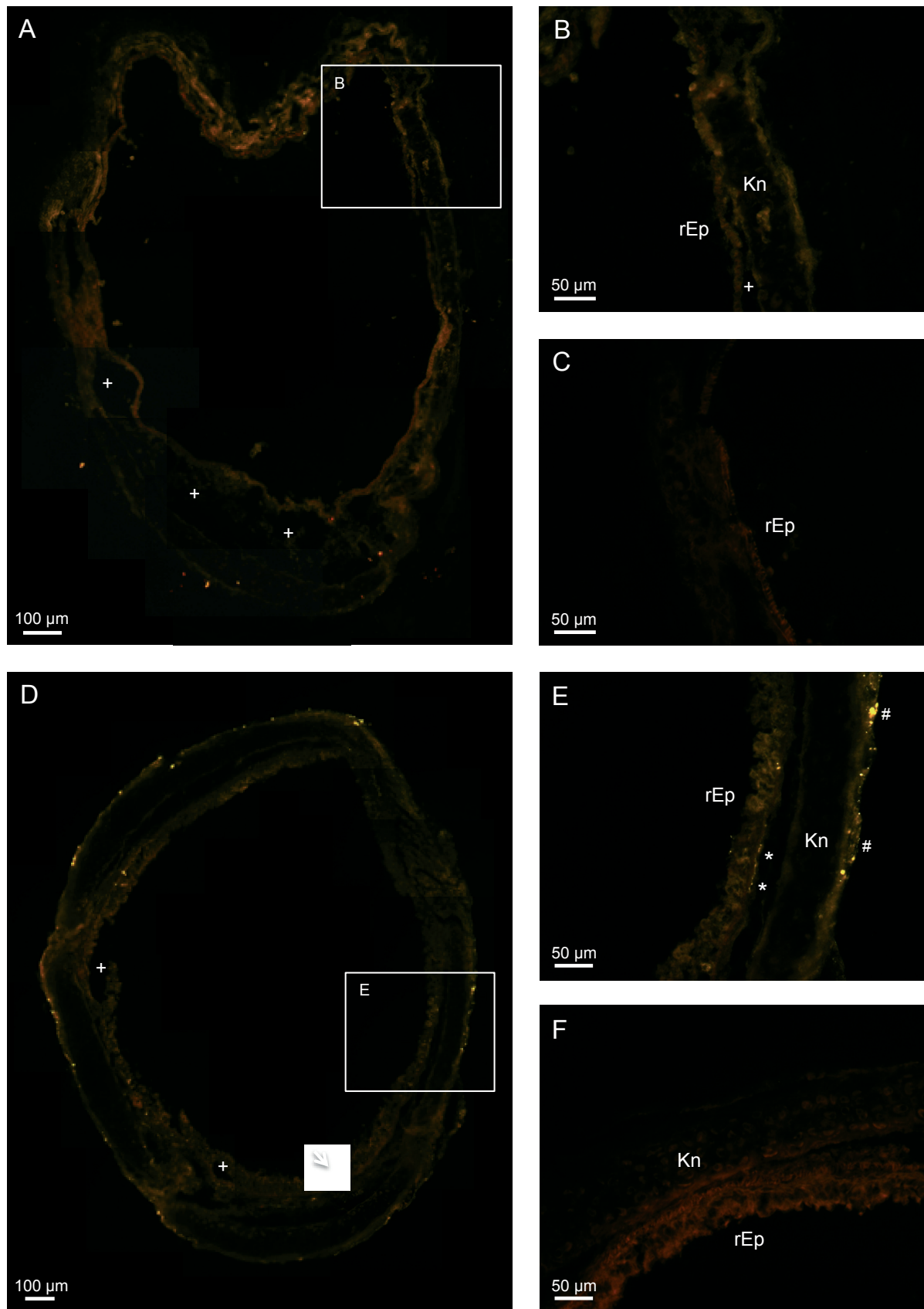


Abbildung 3.13: CRGP-Immunreaktion im Querschnitt der Trachea der Maus: (A) Trachea nach organotypischer Kultur (Fotomontage mehrerer Einzelbilder). (B) Vergrößerter Ausschnitt. (C) Negativkontrolle ohne Primärantikörper. (D) Trachea ohne organotypischer Kultur (Fotomontage mehrerer Einzelbilder). (E) vergrößerter Ausschnitt. (F) Negativkontrolle ohne Primärantikörper. rEp: Epithel, Kn: Trachealknorpel, *:

subepithelial gelegene Nervenfasern, #: Nervenfasern in der Tunika adventitia, Pfeil: neuroendokrine Zellen; +: Abriss der Lamina propria. (Primärantikörper: Kaninchen Anti-CGRP, 1:36.000; Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen-Ig Cy3-konjugiert, 1:2000).

Zusammenfassend konnte bisher gezeigt werden, dass CA und andere TRPA1-Agonisten für eine TRPA1-Rezeptor-vermittelte Bronchokonstriktion verantwortlich sind, welche durch eine nicht durch den TRPA1-Rezeptor vermittelte Bronchodilatation überlagert wird. Im Speziellen konnte in diesem Versuchsabschnitt gezeigt werden, dass C-Faser-Neurone in der TRPA1-Rezeptor vermittelte Bronchokonstriktion eine wesentliche Rolle spielen.

3.3 Untersuchung möglicher Signalwege für die CA-induzierte Bronchodilatation

3.3.1 Wirkung des COX-Inhibitors Indomethacin auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA

Indomethacin ist ein nicht-selektiver Inhibitor der COX (COX-1 und COX-2), welche wesentliche Enzyme am Anfang der Prostaglandinsynthese sind.

Bei insgesamt 7 Trachealstücken wurde eine Minute vor MCH-Gabe 7,5 μ l einer 10 mM Indomethacin-Stammlösung in das Organbad gegeben, so dass im Organbad eine Endkonzentration von 5 μ M erreicht wurde. Die maximale MCH-induzierte Bronchokonstriktion betrug nach 15 Minuten im Mittel 951 ± 81 mg und war somit signifikant höher als die Vorspannung der Trachealstücke (304 ± 2 mg; $p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Nach der Gabe von CA (650 μ M) sank die Kontraktionskraft signifikant auf 712 ± 55 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest), was einer Relaxation von 40 ± 4 % entsprach. Bei einer CA-Konzentration von 1250 μ M sank die Kontraktionskraft signifikant weiter auf 446 ± 47 mg (84 ± 6 %; $p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest; Abbildung 3.14).

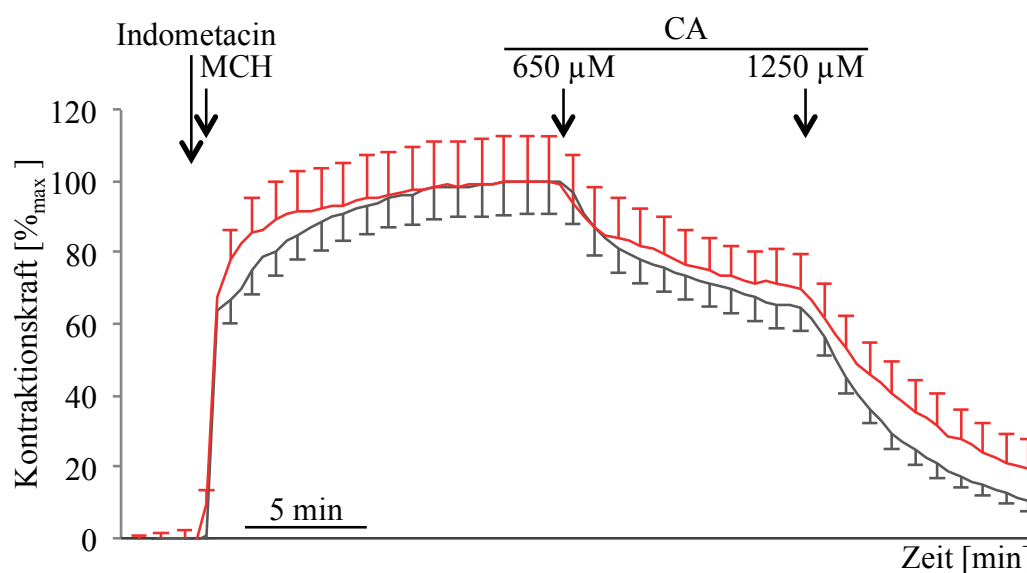


Abbildung 3.14: Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-assoziierten Relaxation nach Methacholingabe (MCH; 100 μ M) für die Versuchsreihe mit Indomethacin (rot; 5 μ M; n = 7) als Blocker verglichen mit der Kontrollgruppe (grau; n = 17) im zeitlichen Verlauf.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Relaxation verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.15).

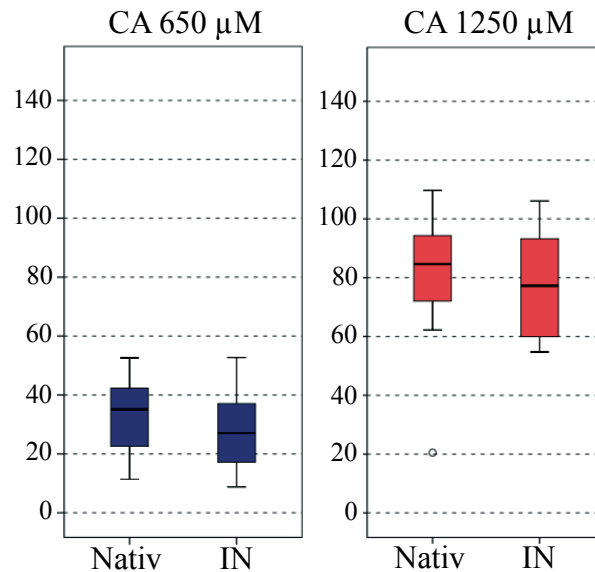


Abbildung 3.15: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von Trachealstücken mit Indomethacin als Blocker (IN; $n = 7$) und der Kontrolle (Nativ; $n = 17$) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 μM [blau] und 1250 μM [rot]). Bei beiden Konzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und mit Blocker behandelter Trachea gefunden werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

3.3.2 Wirkung des NK_1 -Rezeptor-Antagonisten RP-67580 auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA

Die Aktivierung des NK_1 -Rezeptors des Trachealepithels führt bei Ratten zu einer Bronchodilatation (DEVILLIER et al., 1992). Um eine Beteiligung dieses Signalwegs zu überprüfen, wurde in diesem Versuch die Wirkung des selektiven NK_1 -Rezeptor-Antagonisten RP-67580 (20 nM) auf die CA-induzierte Bronchodilatation untersucht. Dazu wurde die Reaktion von sechs vorkontrahierten Trachealstücken auf CA untersucht, nachdem diese mit RP-67580 behandelt wurden. Nach MCH-Gabe (100 μM) konnte ein signifikanter Anstieg der Kontraktionskraft auf maximal 1228 ± 157 mg beobachtet werden ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Auch in diesem Versuch konnte bei beiden CA-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.17). Verglichen mit der maximalen Kontraktionskraft konnte eine signifikante Relaxation (beide $p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) sowohl bei einer CA-Konzentration von 650 μM als auch bei einer CA-Konzentration von 1250 μM beobachtet werden. Diese betrug 23 ± 2 % (1008 ± 117 mg) bei einer CA-Konzentration von 650 μM und 74 ± 3 % (521 ± 39 mg) bei einer CA-Konzentration von 1250 μM (Abbildung 3.16).

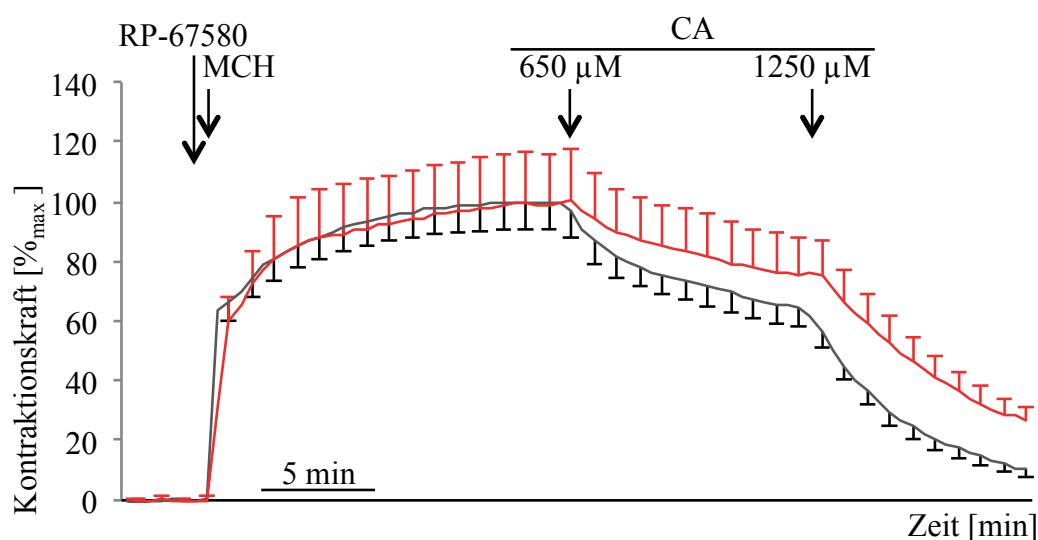


Abbildung 3.16: Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-assoziierten Relaxation nach Methacholingabe (MCH; 100 μM) für die Versuchsreihe mit RP-67580 (20 nM; rot) als Blocker im zeitlichen Verlauf ($n = 6$) sowie die Kontrollgruppe (grau; $n = 17$).

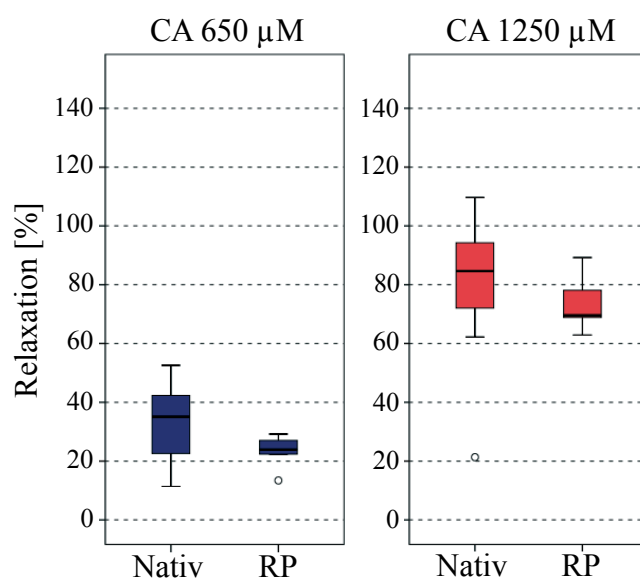


Abbildung 3.17: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von Trachealstücken mit RP-67580 als Blocker (RP; $n = 6$) und der Kontrolle (Nativ; $n = 17$) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 μM [blau] und 1250 μM [rot]). Bei beiden Konzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und mit Blocker behandelter Trachea gefunden werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

3.3.3 Wirkung des Kaliumkanal-Blocker Iberitoxin auf die dilatatorische Wirkung von CA

Iberitoxin ist ein selektiver Kaliumkanal-Blocker (high conductance calcium sensitive potassium channel, BK_{CA}). Zur Untersuchung der Wirkung dieses Kaliumkanal-Blockers auf die Atemwegsdilatation wurden sechs Trachealstücke untersucht (Abbildung 3.18). Nach der Vorkontraktion mit MCH konnte ein signifikanter Anstieg auf eine maximale Kontraktionskraft von 1245 ± 45 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) beobachtet werden. Die CA-induzierte Relaxation bei $650 \mu\text{M}$ betrug $35 \pm 4 \%$ (941 ± 38 mg). Dies entsprach einer signifikanten Relaxation im Vergleich zur maximalen MCH-induzierten Kontraktion ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest), jedoch konnte kein signifikanter Unterschied der Relaxation verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Auch die bronchodilatatorische Wirkung bei $1250 \mu\text{M}$ CA ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.19). Die Kontraktionskraft nach der Gabe von $1250 \mu\text{M}$ CA betrug 485 ± 39 mg ($89 \pm 6 \%$), was sowohl einem signifikanten Abfall verglichen mit der maximalen Kontraktionskraft nach MCH-Stimulation ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) als auch einer signifikant höheren Relaxation verglichen mit der Relaxation bei $650 \mu\text{M}$ entsprach ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest).

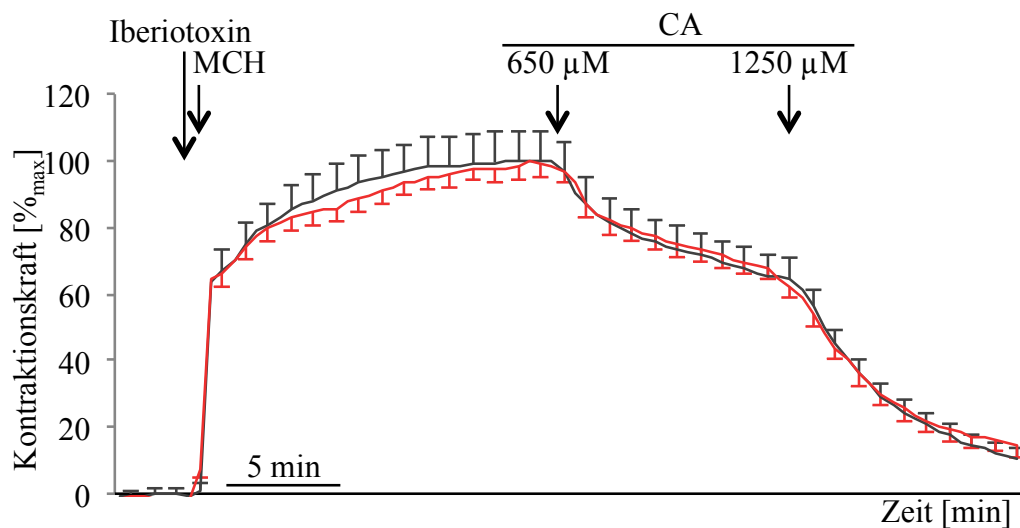


Abbildung 3.18: Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-assoziierten Relaxation nach Methacholingabe (MCH; $100 \mu\text{M}$) im zeitlichen Verlauf. Vor der Vorkontraktion mit MCH wurde der Kaliumkanal-Blocker Iberitoxin (IbTx; rot; $n = 6$) in einer Konzentration von 1 nM dem Organbad hinzugefügt.

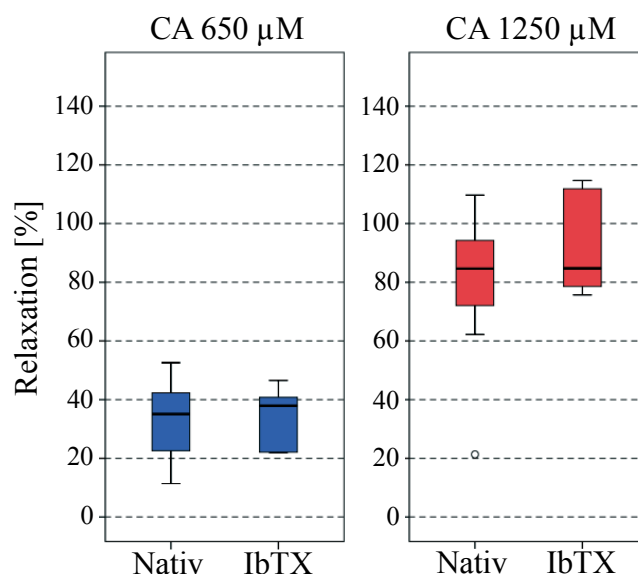


Abbildung 3.19: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von Trachealstücken ohne Blocker (Nativ; $n = 17$) und mit Kaliumkanal-Blocker (IbTX; $n = 6$) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 μM [blau] und 1250 μM [rot]). Ein signifikanter Unterschied konnte weder bei einer CA-Konzentration von 650 μM , noch bei einer Konzentration von 1250 μM festgestellt werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

3.3.4 Wirkung des NOS-Inhibitors L-NNA auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA

Die Funktion von Stickstoffmonoxid (NO) als Bronchodilatator ist in der Literatur gut beschrieben (DUPUY et al., 1992; RICCIARDOLO, 2003; DRAKE et al., 2013). Um die Beteiligung von NO an der CA-vermittelte Bronchodilatation zu untersuchen, wurde in diesem Versuch L-NNA als NOS-Inhibitor verwendet.

Wie bei den vorangegangene Versuchen wurde L-NNA (10 μM) kurz vor der Zugabe von MCH (100 μM) in das Organbad hinzugegeben (Abbildung 3.20). 15 Minuten nach der Stimulation mit MCH konnte ein signifikanter Anstieg verglichen mit der Vorspannung der Kontraktionskraft auf maximal $1187 \pm 86 \text{ mg}$ ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) gemessen werden. Bei einer CA-Konzentration von 650 μM konnte eine signifikante Relaxation verglichen mit der maximalen Kontraktionskraft nach MCH-Gabe von $29 \pm 5 \%$ ($934 \pm 72 \text{ mg}$; $p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) beobachtet werden. Nachdem die CA-Konzentration auf 1250 μM erhöht wurde, sank die Kontraktionskraft signifikant auf $428 \pm 18 \text{ mg}$ ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest), was einer Relaxation von $85 \pm 2 \%$ entsprach. Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte jedoch für beide CA-Konzentrationen

kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (beide $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.21).

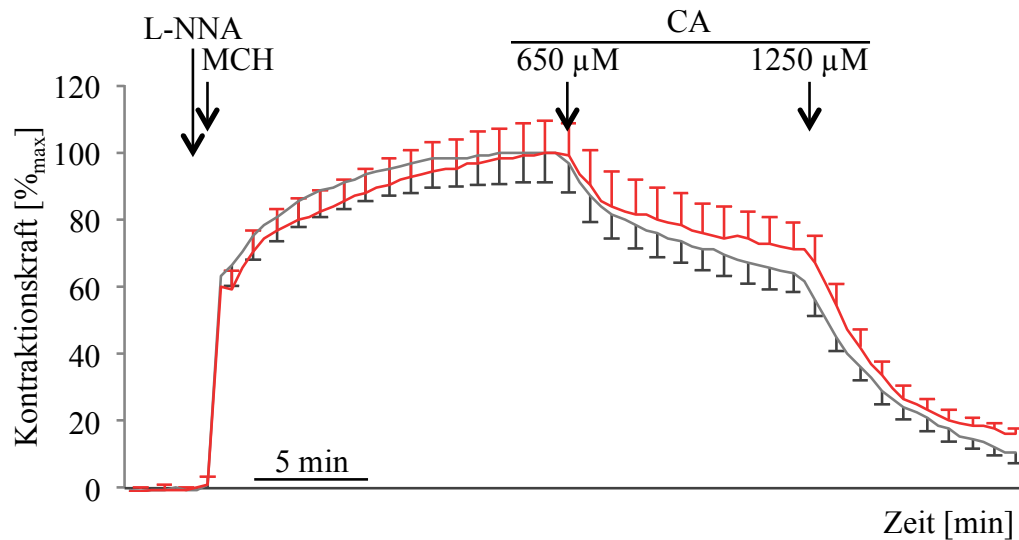


Abbildung 3.20: Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-assoziierten Relaxation nach Methacholingabe (MCH; 100 μM) mit (rot; $n = 6$) und ohne (grau; $n = 16$) dem NOS-Inhibitor N^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA; 10 μM) im zeitlichen Verlauf.

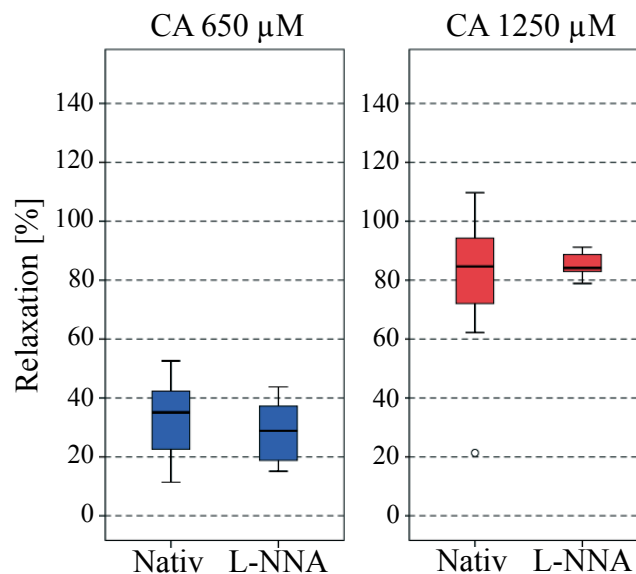


Abbildung 3.21: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von Trachealstücken mit dem NOS-Inhibitor N^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA; $n = 6$) und ohne Blocker (Nativ; $n = 17$) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 μM [blau] und 1250 μM [rot]). Der Unterschied ist bei beiden Konzentrationen nicht signifikant ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

3.3.5 Wirkung des Natriumkanal-Blockers Tetrodotoxin auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA

Tetrodotoxin ist ein Blocker der spannungsaktiven Natriumkanäle. Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurde den im Organbad auf 287 ± 8 mg vorgespannten Trachealstücken Tetrodotoxin (100 nM) 30 Sekunden vor MCH (100 μ M) dem Bad hinzugefügt. Nach 15 Minuten konnte ein signifikanter Anstieg der Kontraktionskraft verglichen mit der Kraft der Vorspannung von 1121 ± 87 mg beobachtet werden ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Bei einer CA-Konzentration von 650 μ M sank die Kontraktionskraft verglichen mit der maximalem MCH-induzierten Kontraktionskraft signifikant auf 909 ± 97 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest), was einer Relaxation von 27 ± 6 % entsprach. 10 Minuten nachdem die CA-Konzentration im Organbad auf 1250 μ M erhöht wurde, sank die Kontraktionskraft weiter auf einen Wert von 456 ± 70 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Umgerechnet entspricht dies einer Relaxation von 82 ± 6 % (Abbildung 3.22).

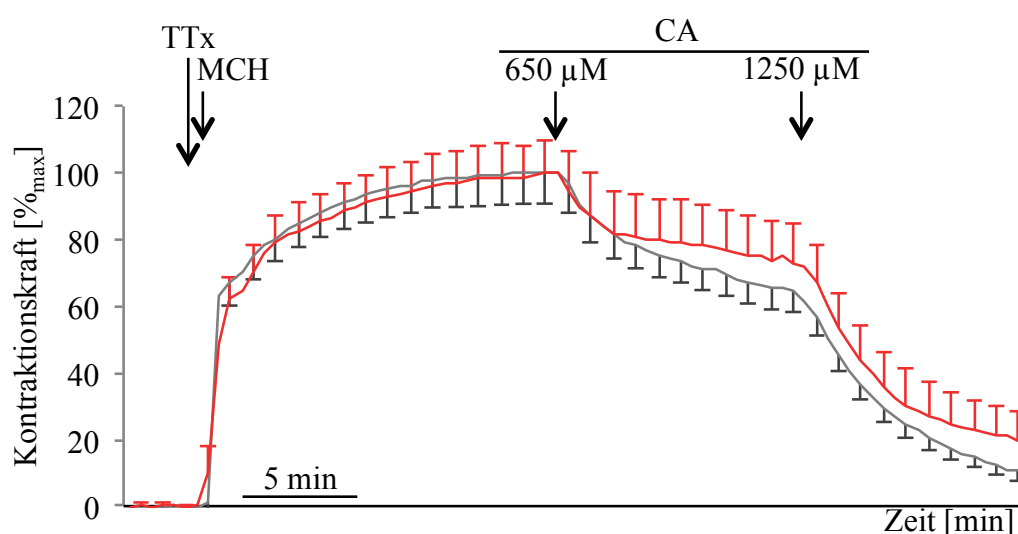


Abbildung 3.22: Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-assoziierten Relaxation nach Methacholingabe (MCH; 100 μ M) im zeitlichen Verlauf. Vor der Vorkontraktion mit MCH wurde der Natriumkanal-Blocker Tetrodotoxin (TTx; rot; $n = 6$) in einer Konzentration von 100 nM dem Organbad hinzugefügt.

Auch in diesem Versuchsteil konnte bei beiden CA-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied in der Relaxation verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet werden (beide $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.23).

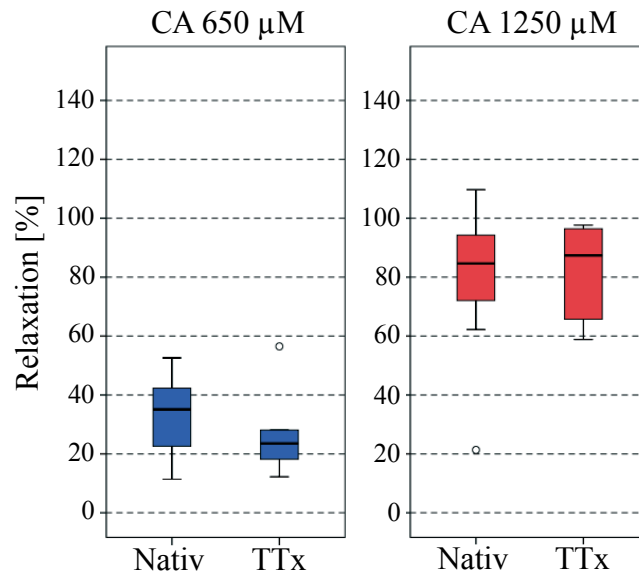


Abbildung 3.23: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von Trachealstücken mit Natriumkanal-Blocker Tetrodotoxin (TTx; n = 6) und ohne Blocker (Nativ; n = 17) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 µM [blau] und 1250 µM [rot]). Der Unterschied ist bei beiden Konzentrationen nicht signifikant ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

3.3.6 Wirkung des β -Adrenorezeptorenblockers Propranolol auf die bronchodilatatorische Wirkung von CA

Citral, ein Bestandteil des Ingweröls, bewirkte ebenfalls eine bronchodilatatorische Wirkung auf mit Carbachol vorkontrahierte Trachealstücke der Ratte. Dieser myorelaxierende Effekt konnte mit Propranolol, einem Antagonisten der β -adrenergen Rezeptoren, aufgehoben werden, was auf eine Beteiligung dieser Rezeptoren schließen lässt (MANGPRAYOOL et al., 2013). Um eine mögliche Beteiligung der β -adrenergen Rezeptoren am bronchodilatatorischen Effekt von CA zu untersuchen, wurden nachfolgend sechs Trachealstücke mit Propranolol (10 µM) behandelt. Die maximale Kontraktionskraft stieg nach MCH-Gabe signifikant auf 1236 ± 126 mg ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest). Nachdem dem Organbad 650 µM CA hinzugefügt wurde, sank die Kontraktionskraft auf 974 ± 88 mg (Abbildung 3.24). Verglichen mit der maximalen MCH-induzierten Kontraktionskraft war der Abfall der Kontraktionskraft signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) und entsprach einer Relaxation von 28 ± 5 %. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Bei einer CA-Konzentration von 1250 µM sank die Kontraktionskraft signifikant, sowohl verglichen mit der maximalen Kontraktionskraft ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest) als auch im Vergleich zur Relaxation nach Gabe von

650 μM CA ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest), auf einen Wert von 470 ± 54 mg (83 ± 6 %). Verglichen mit der Kontrollgruppe war auch der Unterschied der Relaxation bei einer CA-Konzentration von 1250 μM auch hier nicht signifikant ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 3.25).

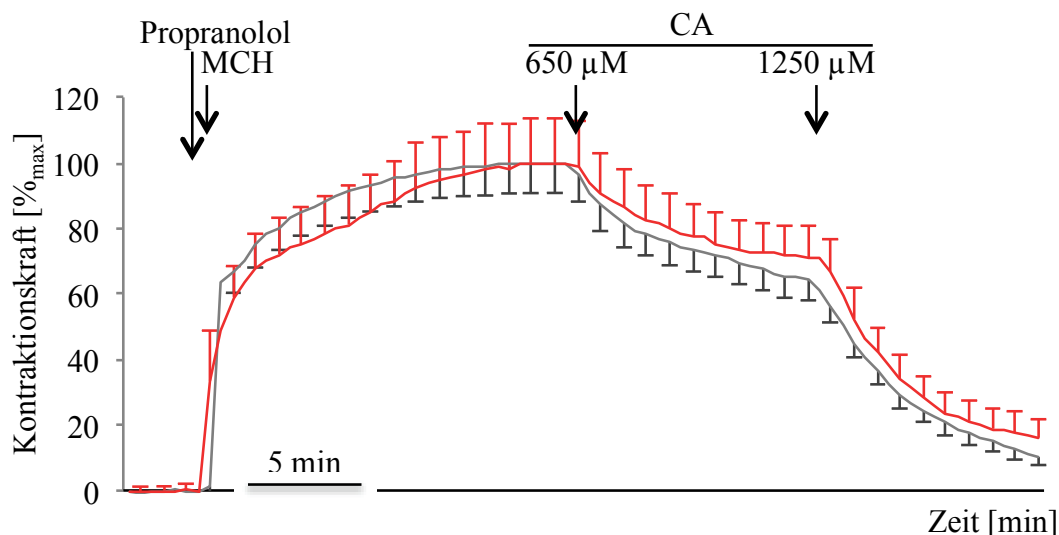


Abbildung 3.24: Dargestellt sind der Mittelwert und SEM in Prozent der maximalen Kontraktion der Zimtaldehyd (CA)-assoziierten Relaxation nach Methacholingabe (MCH; 100 μM) im zeitlichen Verlauf. Vor der Präkontraktion mit MCH wurde dem Organbad der β -Adrenorezeptorenblocker Propranolol (rot; $n = 6$) in einer Konzentration von 10 μM hinzugefügt.

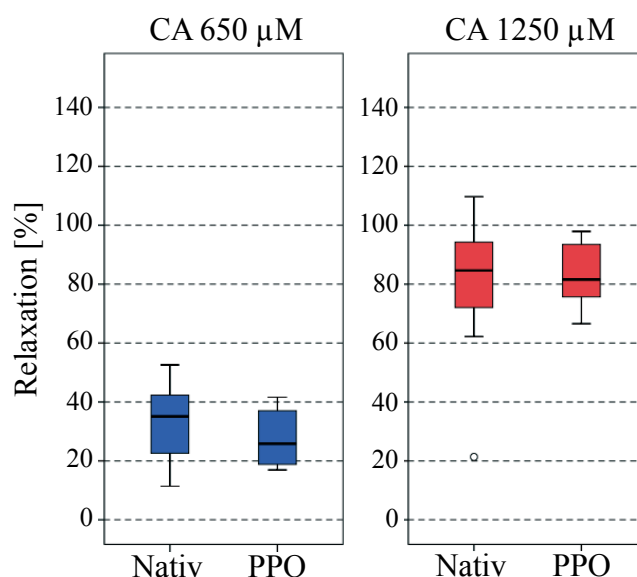


Abbildung 3.25: Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Relaxation von Trachealstücken mit β -Adrenorezeptorenblocker Propranolol (PPO; $n = 6$) und ohne Blocker (Nativ; $n = 17$) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CA (650 μM [blau] und 1250 μM [rot]). Der Unterschied ist bei beiden Konzentrationen nicht signifikant ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die beiden Extremwerte.

3.3.7 Nachweis des TRPV3-Rezeptors in den Atemwegen und atemwegsinnervierenden Neuronen

Expression von TRPV3 in den unteren Atemwegen

Als Erstes wurde die TRPV3-mRNA Expression in der Lunge, der Trachea und den Hauptbronchien untersucht. Wie in Abbildung 3.26 zu sehen ist, wird TRPV3-mRNA sowohl in der Lunge als auch in den Hauptbronchien und der Trachea exprimiert.

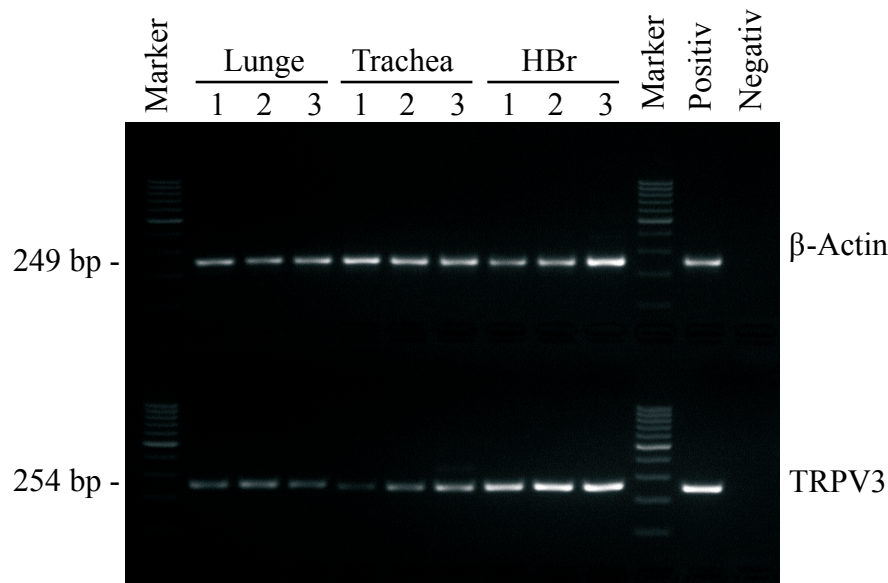


Abbildung 3.26: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte zeigt die TRPV3-Expression in Trachea, Hauptbronchus und der Lunge von jeweils drei Mäusen mit Positivkontrollen (TRPV3: Dünndarm; β -Aktin: JNC) und Wasserkontrollen (negativ).

Um die Expression von TRPV3 in der Trachea näher zu charakterisieren, wurden Trachealschnitte mit Hilfe eines TRPV3-spezifischen Antikörpers angefärbt (Abbildung 3.27).

Im Überblick (Abbildung 3.27 A) ist eine deutliche Immunreaktivität nach Inkubation mit dem TRPV3-spezifischen Antikörper im Trachealepithel sowie eine mäßige Immunreaktivität in der glatten Muskulatur zu erkennen. Da die für die Färbung verwendeten Trachealstücke vor der Fixierung in Organbadversuchen verwendet wurden, sind in diesen Schnitten mechanische Schäden in der Lamina propria sowie Defekte im Trachealepithel zu beobachten (Abbildung 3.27, B, +). Bei weiterer Vergrößerung bestätigte sich der Befund, dass eine TRPV3-Immunreaktivität hauptsächlich in den Epithelzellen zu beobachten ist. Daneben konnten jedoch vereinzelt immunreaktive Zellen in der Lamina propria beobachtet werden (#), sowie eine Immunreaktion der Knorpelzellen.

Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Blocking-Peptids oder einer TRPV3-Knockout-Maus konnte die TRPV3-spezifische Bindung des Antikörpers nicht weiter überprüft werden. Deshalb wurde von vier Tracheen das Epithel mit einer kleinen Bürste (Dentalbürste) entfernt und die mRNA-Expression von TRPV3 in diesen Zellen untersucht.

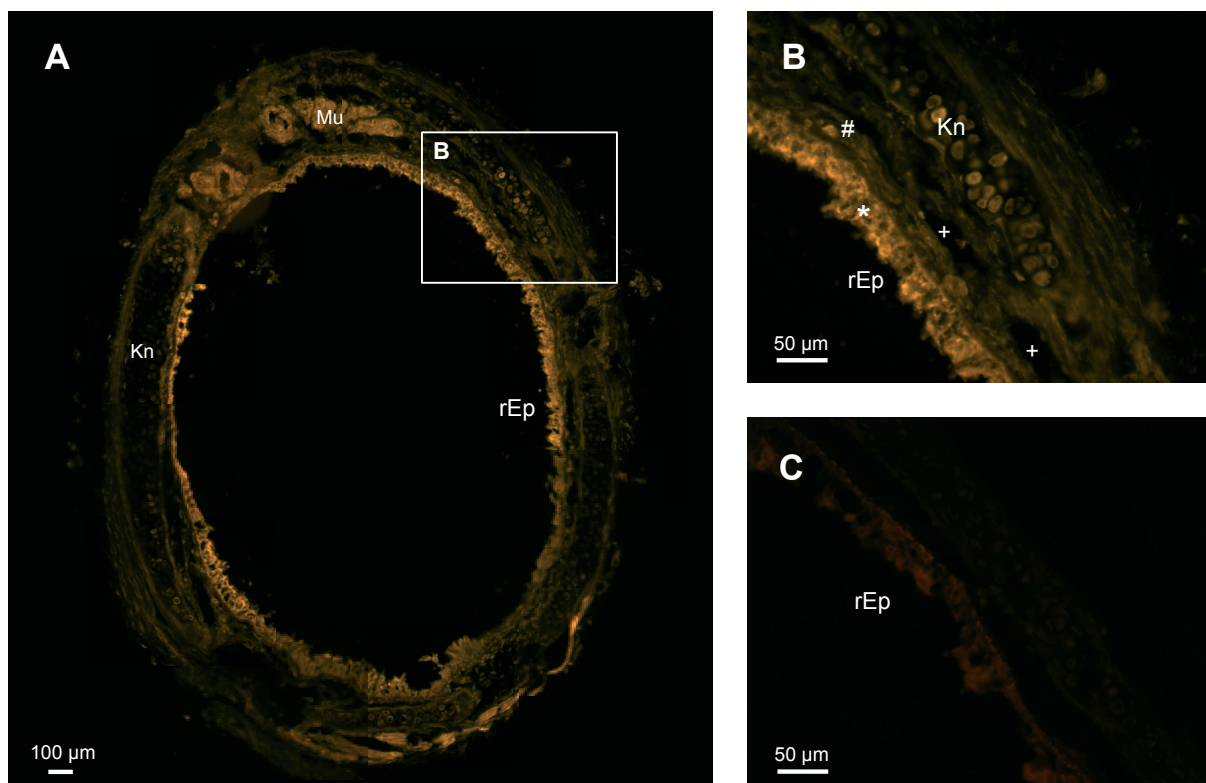


Abbildung 3.27: TRPV3-immunreaktive Zellen im Querschnitt der Trachea der Maus: (A) Überblick der TRPV3-Immunreaktivität im gesamten Trachealquerschnitt (Fotomontage mehrerer Einzelbilder). (B) vergrößerter Ausschnitt (Kn: Trachealknorpel, rEp: Epithel, Mu: Muskulatur, +: Defekte im Präparat, *: immunreaktive Zellen im Trachealepithel, #: immunreaktive Zellen in der Lamina propria). (C) Kontrolle ohne Primärantikörper (Primärantikörper: Anti-TRPV3-Antikörper, 1:1600; Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen-Ig Cy3-konjugiert, 1:2000)

In den so gewonnenen Zellen (Trachealepithel-Brush; TEB) konnte die mRNA-Expression von TRPV3 nachgewiesen werden, wobei nicht ausgeschlossen werden konnte, dass mit dieser Methode neben Epithelzellen noch Zellen anderen Ursprungs, wie Lymphozyten, gewonnen wurden (Abbildung 3.28).

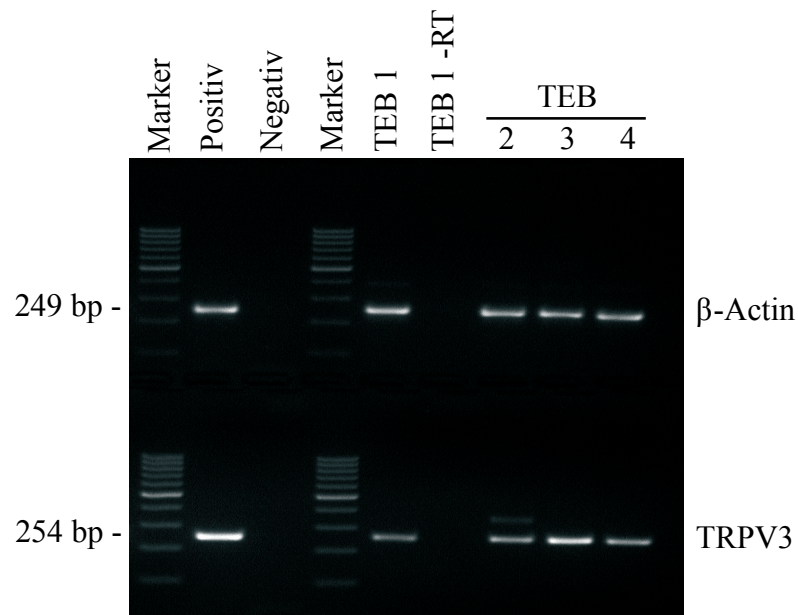


Abbildung 3.28: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte zeigt die TRPV3-Expression in mechanisch abgeschabten Zellen der Trachealschleimhaut (Trachealepithel-Brush, TEB) von insgesamt vier Mäusen mit Positivkontrollen (TRPV3: Dünndarm; β -Actin: Ggl. jugulare nodosum) und Wasserkontrolle (Negativ).

TRPV3-Immunreaktivität konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie im Trachealquerschnitt vor allem in Epithelzellen, aber auch in der glatten Muskulatur detektiert werden. In den TEB-Zellen konnte im vorangegangenen Versuch ein mRNA-Expression gezeigt werden, wobei in diesem Versuch unklar blieb, ob die detektierte mRNA-Expression tatsächlich aus den Epithelzellen stammt. Um die mRNA-Expression von TRPV3 in den Epithelzellen und Zellen der glatten Muskulatur weiter einzugrenzen, wurden von insgesamt drei Mäusen Epithelzellen und Muskelzellen der Trachea mit Hilfe der Lasermikrodissektion gewonnen und auf die mRNA-Expression von TRPV3 untersucht (Abbildung 3.29).

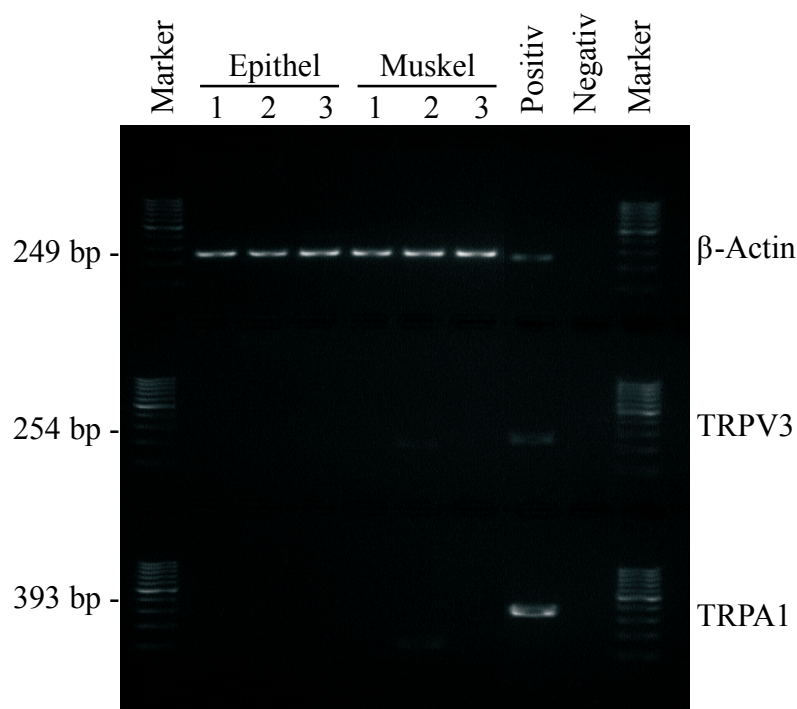


Abbildung 3.29: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte zeigt keine Expression von TRPV3 oder TRPA1 in mittels Lasermikrodissektion gewonnenen Einzelzellen des Trachealepithels und Trachealmuskelzellen von jeweils drei Mäusen mit Positivkontrolle (TRPV3: Dünndarm; β-Actin: Ggl. jugulare nodosum) und Wasserkontrollen (Negativ).

In den mit Hilfe der Lasermikrodissektion gewonnen Proben konnte weder die Expression von TRPA1 noch die Expression von TRPV3 nachgewiesen werden (Abbildung 3.29).

Expression von TRPV3 in den Spinalganglien und im Ggl. jugulare nodosum

Die Beteiligung von epithelialen TRPV3-Rezeptoren konnte im vorangegangenen Abschnitt funktionell ausgeschlossen werden, wenngleich die Expression nicht eindeutig bewiesen werden konnte. Neben der Expression im Epithel könnte TRPV3, ähnlich wie TRPA1, in den sensorischen Neuronen exprimiert sein und auf bislang ungeklärten Wege am bronchodilatatorischen Effekt beteiligt sein. Die Expression von TRPV3 in den sensorischen Neuronen wurde untersucht. Als erstes wurde die Expression von TRPV3 in kompletten Ganglien (Spinalganglien, Ggl. jugulare nodosum) untersucht. Wie in Abbildung 3.30 dargestellt, wird TRPV3 sowohl in den Spinalganglien als auch im Ggl. jugulare nodosum exprimiert.

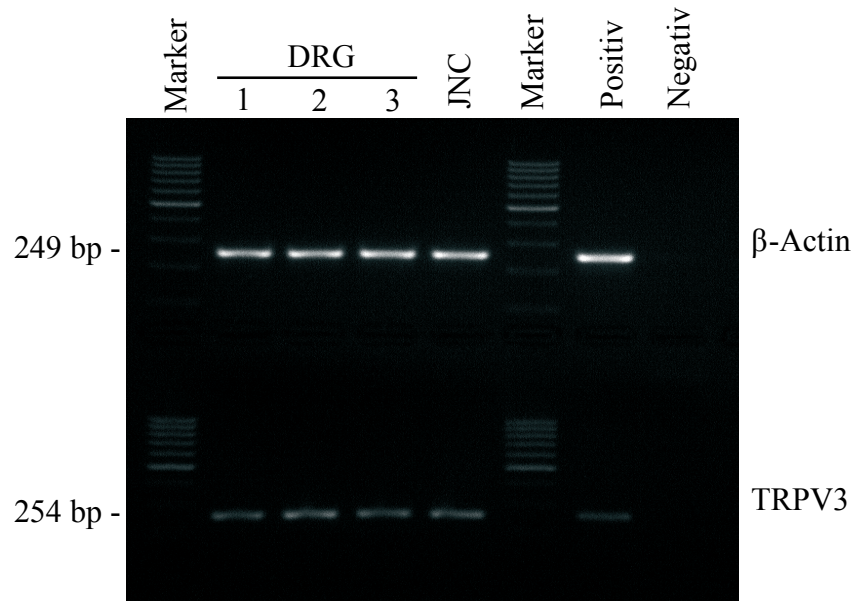


Abbildung 3.30: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte zeigt die TRPV3-Expression in Spinalganglien (DRG) von drei Mäusen sowie in einem Ggl. jugulare nodosum (JNC) mit Positivkontrolle (β -Actin: Ggl. jugulare nodosum, TRPV3: Dünndarm) und Wasserkontrolle (Negativ).

Um atemwegsinnervierende Neurone des JNC auf die Expression von TRPV3 zu prüfen, wurden diese mit Hilfe von Aminostilbamidin retrograd markiert (siehe Kapitel 2.2). Nach der Entnahme des Gewebes wurden die Ganglien dissoziiert auf Deckgläschen ausgesät und die atemwegsinnervierenden Neurone unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und gepickt. Bei der anschließenden RT-PCR dieser Einzelzellen konnte die Expression des TRPV3-Rezeptors jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.31).

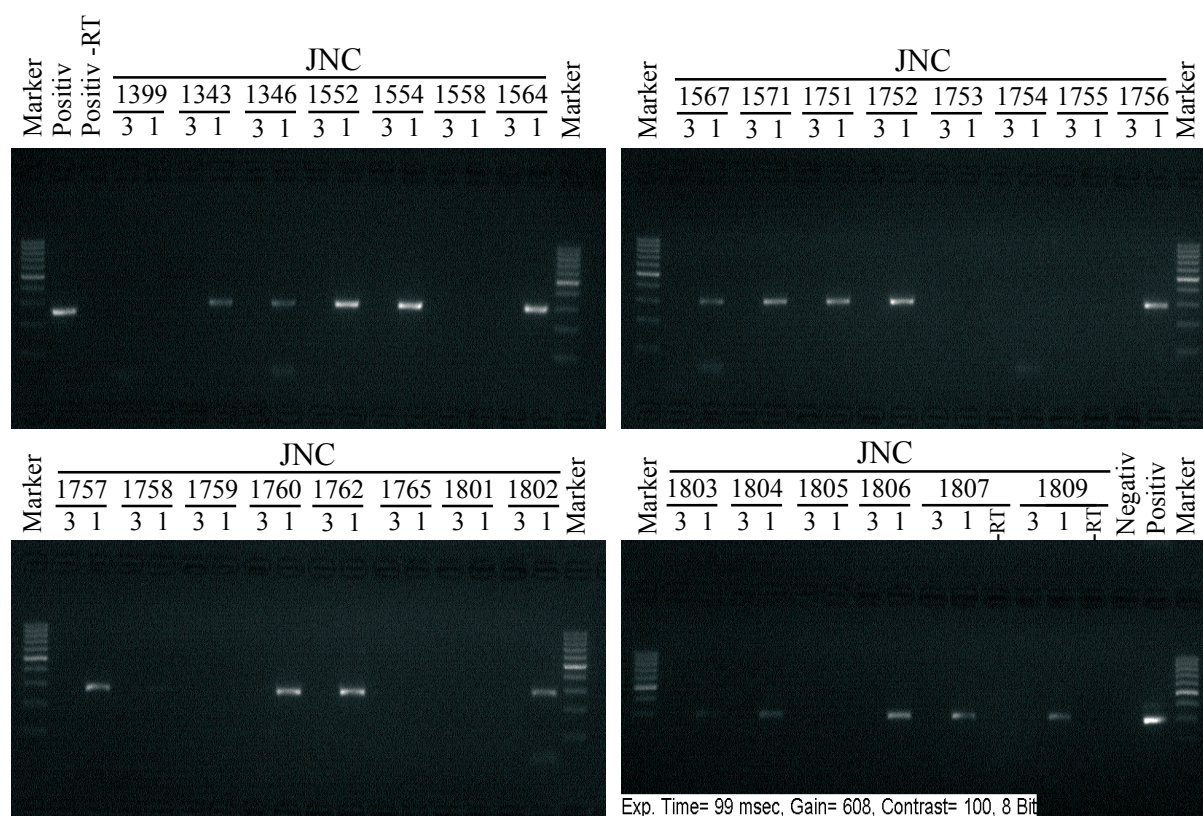


Abbildung 3.31: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte zeigt die Expression von TRPV3 (3) und TRPV1 (1) in einzel gepickten, atemwegsinnervierenden Neuronen des Ggl. jugulare nodosum (JNC 1399 - 1809). Im Gegensatz zu TRPV1 konnte keine TRPV3-Expression in den untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für die verwendeten Primer wurde cDNA aus ganzen Ggl. jugulare nodosum verwendet. Wasserkontrollen (Negativ)

Zusammengefasst konnte die Beteiligung von TRPV3 am bronchodilatatorischen Effekt von CA funktionell ausgeschlossen werden; auch wenn eine epitheliale Expression von TRPV3 zu beobachten war, konnte dessen funktionelle Relevanz nicht eindeutig geklärt werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Wirkung von CA auf isolierte Trachealstücke

Die Ausgangshypothese dieser Arbeit war, dass CA, ein TRPA1-Agonist, eine Bronchokonstriktion durch periphere Mechanismen bewirkt. Als Methode, um diese Mechanismen genauer zu untersuchen, wurde das Organbad gewählt. Dieses ermöglicht die Messung der isometrischen Kontraktionskraft der glatten Atemwegsmuskulatur (ASM) und somit die direkte Messung der Bronchokonstriktion an vitalen Trachealstücken mit physiologischem Zellverbund bei gleichzeitiger Entkopplung von zentralen Reflexen. Überraschenderweise wurde anstelle der erwarteten Bronchokonstriktion eine dosisabhängige bronchodilatatorische Wirkung von CA beobachtet. Diese stimmt zwar mit den Ergebnissen aus Head-Out-Bodyplethysmographie-Versuchen überein (kommuniziert Ch. NASSENSTEIN, Gießen), steht jedoch im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Ergebnissen (ANDRÉ et al., 2008) sowie zur vermuteten Funktion von TRPA1-Kanälen in den Atemwegen (GRACE et al., 2014). Um die Genese der beobachteten Bronchodilatation weiter zu untersuchen, wurden die Trachealstücke mit MCH, einem Muskarinrezeptor-Agonisten, vorkontrahiert. MCH führt durch die Bindung an muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) zu einer Bronchokonstriktion und wird in der Humanmedizin bei Provokationstests zur Diagnose des Asthma bronchiale verwendet (COCKCROFT & DAVIS, 2009). Die in dieser Arbeit verwendete MCH-Konzentration führte in Vorversuchen zu einer maximalen und anhaltenden Bronchokonstriktion. Interessanterweise war auch die durch MCH herbeigeführte Bronchokonstriktion durch CA dosisabhängig reversibel. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen einer während der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit publizierten Studie, in der ähnliche CA-Konzentrationen verwendet wurden (CHEAH et al., 2014). Die bronchodilatatorische Wirkung von 500 μM CA lag jedoch nur bei $24 \pm 7 \%$ (CHEAH et al., 2014) und war somit deutlich geringer als der in der vorliegenden Arbeit beobachtete bronchodilatatorische Effekt ($69 \pm 4 \%$). Die Reproduzierbarkeit der MCH-vermittelten Bronchokonstriktion und CA-vermittelten Bronchodilatation nach dem Auswaschen macht eine zytotoxische Wirkung von CA als Ursache für die Bronchodilatation unwahrscheinlich. Vergleichbare Resultate wurden auch mit Acrolein, einem anderen TRPA1-Agonisten beobachtet (CHEAH et al., 2014). Neben den beiden genannten Substanzen zählt auch

Isofluran zu den TRPA1-Agonisten (MATTA et al., 2008; EILERS et al., 2010). Isofluran wurde in dieser Arbeit als Anästhetikum bei der Tötung der Tiere verwendet, weshalb es zu einer Desensibilisierung oder Blockade der TRPA1-Rezeptoren bei der Tötung gekommen sein könnte. Die Reproduzierbarkeit der Versuche spricht jedoch eher dafür, dass Isofluran keine Funktionseinschränkungen des TRPA1-Rezeptors zur Folge hat. Des weiteren sind durch mehrmaliges Überführen der Trachealstücke in frisches Medium zwischen der Entnahme und der Messung sowie der volatilen Eigenschaft von Isofluran pharmakologisch relevante Isofluranrückstände im Trachealgewebe zum Versuchszeitpunkt unwahrscheinlich, wurden jedoch nicht quantifiziert.

Neben dem elektrophilen TRPA1-Agonisten CA wurden in der vorliegenden Arbeit weitere elektrophile TRPA1-Agonisten, wie AITC und Acrolein, aber auch nicht-elektrophile TRPA1-Agonisten wie Carvacrol, 2-APB und Thymol, auf ihre bronchodilatatorische Wirkung untersucht. Die Tatsache, dass sowohl elektrophile als auch nicht-elektrophile TRPA1-Agonisten in der Lage waren, eine dosisabhängige Bronchodilatation bei vorkontrahierten Trachealstücken herbeizuführen, deutet stark auf eine TRPA1-rezeptorspezifische Wirkung der Agonisten als Ursache für die Bronchodilatation hin.

Die Interaktion aller verwendeten elektrophilen (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; LEE et al., 2008) und nicht-elektrophilen Agonisten (BESSAC & SIVULA, 2008; SAWADA et al., 2008; IBARRA & BLAIR, 2013) mit TRPA1 wurde eingehend beschrieben. Auch die verwendeten Konzentrationen der TRPA1-Agonisten sind biologisch relevant und in der Lage, TRPA1-Kanäle zu öffnen (LEE & PISARRI, 2001; JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; HINMAN et al., 2006; XU et al., 2006; IBARRA & BLAIR, 2013; ZHOU et al., 2013; CHEAH et al., 2014). Unterschiede in den beobachteten EC₅₀-Konzentrationen zwischen Versuchen an Einzelzellen und Versuchen an Gewebestücken erklären sich durch die intrazellulär gelegenen Bindungsstellen des TRPA1-Rezeptors (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2006; MCNAMARA et al., 2007). Dadurch müssen TRPA1-Agonisten erst die Zellmembran durchdringen, um am Rezeptor binden zu können. Die größeren Diffusionsstrecken bei Gewebestücken verglichen mit Einzelzellen sowie Unterschiede in der Permeabilität der Zellmembran der jeweilige Substanz erklären die unterschiedlichen EC₅₀-Konzentrationen (PETERLIN et al., 2007). So konnte bei einer Konzentration von 50 µM Acrolein oder 2-APB eine etwa gleich starke Bronchodilatation beobachtet werden wie bei der 10-fachen Dosis von CA. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen bisheriger Studien überein (CHEAH et al., 2014), wobei im Gegensatz zu CA die

Stärke des bronchodilatatorischen Effekts von vorkontrahierten Trachealstücken von Acrolein und AITC denen anderer Beobachter ähnelt (CHEAH et al., 2014).

Im ersten Versuchsabschnitt dieser Arbeit konnte die bronchodilatatorische Wirkung von elektrophilen TRPA1-Agonisten bestätigt und erstmalig die bronchodilatatorische Wirkung von nicht-elektrophilen TRPA1-Agonisten gezeigt werden, wobei eine toxische Wirkung als Ursache der Bronchodilatation ausgeschlossen wurde. Die beobachtete Bronchodilatation konnte sowohl an mit MCH-vorkontrahierten Trachealstücken als auch an nativen Trachealstücken gezeigt werden.

4.2 Rolle von TRPA1 bei der beobachteten Wirkung von CA

Die Ergebnisse aus dem ersten Versuchsteil, also eine dosisabhängige Bronchodilatation sowohl mit elektrophilen als auch mit nicht-elektrophilen TRPA1-Agonisten, lässt eine TRPA1-Rezeptor-spezifische Reaktion vermuten. Es war somit zu erwarten, dass die beobachtete Bronchodilatation durch den Einsatz von TRPA1-Antagonisten unterdrückt werden kann. Diese Theorie wurde durch die Ergebnisse einer während des experimentellen Teil der Arbeit erschienenen Studie unterstützt. Dabei konnte die durch Acrolein herbeigeführte Bronchodilatation sowohl durch nicht-selektive TRPA1-Kanalblocker als auch durch selektive TRPA1-Kanalblocker unterdrückt werden (CHEAH et al., 2014). Umso erstaunlicher war es, dass in unseren Versuchen sowohl unter Anwesenheit des nicht-selektiven TRPA1-Kanalblockers (Ruthenium Red) als auch von selektiven TRPA1-Kanalblockern (AP-18, HC-030031) weiterhin eine CA-induzierte Bronchodilatation zu beobachten war. Diese Bronchodilatation war sowohl mit selektiven TRPA1-Kanalblockern als auch mit nicht-selektiven TRPA1-Kanalblockern signifikant stärker als bei den Kontrollen ohne TRPA1-Kanalblocker. Dies lässt auf einen TRPA1-medierten bronchokonstriktorischen Effekt schließen und unterstützt die Theorie, dass TRPA1-Rezeptoren an der Atemweghyperreagibilität bei pulmonalen Erkrankungen beteiligt sind (PETERLIN et al., 2007). Ähnlich wie in dieser Arbeit konnte auch eine durch TRPA1-Agonisten (Acrolein, Crotonaldehyd, CA) induzierte Bronchokonstriktion durch TRPA1-Kanalblocker (HC-030031) vollständig unterdrückt werden (ANDRÈ et al., 2008). Im Unterschied zu dieser Arbeit wurden allerdings anstelle von Mäusetracheen Tracheen aus Meerschweinchen verwendet (ANDRÈ et al., 2008), so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieser Effekt speziesunabhängig ist. Die Verwendung von Trachealstücken aus TRPA1-Knockout-Mäusen, welche ebenfalls eine signifikant stärkere CA-induzierte Bronchodilatation als Trachealstücke von Wildtyp-Mäusen zeigten, untermauert die Vermutung, dass TRPA1-Agonisten für die

bronchokonstriktorisches Komponente verantwortlich sind. Gleichzeitig sprechen diese Ergebnisse gegen eine Beteiligung der TRPA1-Kanäle an der beobachteten Bronchodilatation. Vielmehr scheint es, als würden zwei unterschiedliche Effekte vorhanden sein, wobei ein TRPA1-abhängiger bronchokonstriktorisches sowie ein dazu entgegengesetzter TRPA1-unabhängiger bronchodilatatorischer Effekt sich überlagern.

4.2.1 Ätiologie der TRPA1-abhängigen Bronchokonstriktion

Die Ergebnisse der Experimente, bei denen Trachealstücke aus TRPA1-defizienten Mäusen, bzw. TRPA1-Kanalblocker im Organbad verwendet wurden, sprechen für eine durch den TRPA1-Kanal vermittelte bronchokonstriktorisches Komponente von CA. TRPA1-Kanäle sind in der Lunge hauptsächlich in sensorischen Neuronen, deren Zellkörper in den Spinalganglien und dem Ggl. jugulare nodosum lokalisiert sind, exprimiert (STORY et al., 2003; BANDELL et al., 2004; NASSENSTEIN et al., 2008; JANG et al., 2012). Vereinzelt wurde jedoch auch eine nicht-neuronale Expression von TRPA1-Kanälen in der Lunge beschrieben (MUKHOPADHYAY et al., 2011). Um herauszufinden, ob die TRPA1-Expression in sensorischen Neuronen relevant für die CA-induzierte Bronchokonstriktion ist, wurden Trachealstücke nach der Entnahme für fünf Tage inkubiert, um eine Degeneration der sensorischen Neurone zu erreichen („organotypische Kultur“). Obwohl die Dauer der Waller’schen Degeneration in der Literatur bei der Maus mit 1-2 Tage angegeben wird (BEIROWSKI et al., 2005), konnten nach fünftägiger Inkubation weiterhin CGRP-immunreaktive Fasern mittels immunhistochemischer Untersuchung nachgewiesen werden. Verglichen mit frisch isolierten Tracheen konnte jedoch eine deutlich geringere Dichte von CGRP-immunreaktiven Nervenfasern in Trachealstücken nach organotypischer Kultur beobachtet werden. Trachealstücke mit reduzierter sensorischer Innervation nach organotypischer Kultur wiesen eine verstärkte Bronchodilatation auf, was als Hinweis auf eine neuronale Expression der für die Bronchokonstriktion verantwortlichen Rezeptoren hinweist. Da zentrale Reflexe als Ursache für die Bronchokonstriktion durch den Versuchsaufbau ausgeschlossen sind, muss die TRPA1-abhängige Bronchokonstriktion in diesem Modell ausschließlich durch periphere Mechanismen verursacht sein. Dass diese *in vivo* eventuell durch zentrale Reflexe verstärkt werden, ist zwar anzunehmen, war aber nicht Gegenstand dieser Untersuchungen.

Im Folgenden sollte der Mechanismus, durch den die Bronchokonstriktion ausgelöst wird, genauer untersucht werden. Aus diesem Grund wurden Signalwege, über die eine Bronchokonstriktion vermittelt werden könnte, untersucht. Die Aktivierung von sensorischen

Neuronen führt zu einer Freisetzung von Neuropeptiden, wie SP, Neurokinin A sowie CGRP. Deshalb wurden unterschiedliche Blocker dieser Neuropeptide, wie ein NK₁-Rezeptor-Antagonist (RP-67580), und ein Natriumkanalblocker (TTx), welcher die Freisetzung von Vesikeln und damit den Neuropeptiden hemmt, eingesetzt. Obwohl der zugrundeliegende Mechanismus nicht geklärt werden konnte, lassen die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem RP-67580 eine Wirkung vermuten, welche aber nicht statistisch bestätigt werden konnte. Auch wenn die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von RP-67580 bereits bei ähnlichen Versuchen erfolgreich eingesetzt wurde (CHEAH et al., 2014), könnte die Verwendung höherer Konzentrationen des NK₁-Rezeptor-Antagonisten Wirkung zeigen. In der Tat wurde in weiterführenden Versuchen mit höheren Konzentrationen des NK₁-Rezeptor-Antagonisten eine signifikante Wirkung beobachtet, womit eine Beteiligung des Neuropeptids SP an der Bronchokonstriktion wahrscheinlich ist. Ob andere Neuropeptide, wie Neurokinin A oder CGRP, eine Rolle spielen, bleibt Gegenstand weiterer, zukünftiger Untersuchungen.

Sowohl die Funktion von NK₁-Rezeptoren als auch die Funktion von TRPA1-Kanälen werden in der Literatur im Bezug auf den Muskeltonus der ASM kontrovers diskutiert. So wurde gezeigt, dass eine Kombination aus NK₁- und NK₂-Rezeptor-Antagonisten sowie die Desensibilisierung der sensorischen C-Faser Neurone mittels einer 20-minütigen Capsaicin-Inkubation die TRPA1-vermittelte Bronchokonstriktion in isolierten Meerschweincentracheen vollständig unterdrücken konnte (ANDRÈ et al., 2008). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Arbeit eine dosisabhängige Bronchodilatation durch TRPA1-Agonisten in Organbadversuchen mit Trachealstücken aus Mäusen beobachtet (CHEAH et al., 2014), die durch einen NK₁-Rezeptor-Antagonisten (RP-67580) vollständig aufgehoben werden konnte (CHEAH et al., 2014).

In den letzten Jahren rückten TRPA1-Rezeptoren in den Atemwegen zunehmend ins Interesse der Forschung. Es wird vermutet, dass eine Dysregulation von TRPA1-Rezeptoren am Phänotyp von Atemwegserkrankungen maßgeblich beteiligt sein könnte (GRACE et al., 2014). Diese Theorie wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt. So spielen TRPV1-positive Neurone des Ggl. jugulare nodosum, also jene C-Faser Neurone, die zum Teil auch TRPA1-Kanäle exprimieren (NASSENSTEIN et al., 2008), eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Atemwegshyperreagibilität (TRÄNKNER et al., 2014). Zusätzlich wurde die Ausprägung einer Atemwegshyperreagibilität bei TRPA1-defizienten Mäusen vollständig unterdrückt (CACERES et al., 2009), was die Rolle des TRPA1-Rezeptors in den atemwegsinnervierenden Neuronen unterstreicht. Auch durch die Unterdrückung der

Vesikelfreisetzung konnte die Entwicklung einer Atemweghyperreagibilität verhindert werden (TRÄNKNER et al., 2014), wodurch die wichtige Rolle der Neuropeptide unterstrichen wurde. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Neurotoxin TTx eingesetzt, um die Vesikelfreisetzung der sensorischen Neurone zu inhibieren. Jedoch konnte die TRPA1-vermittelten Bronchokonstriktion in dieser Arbeit nicht durch die Verwendung von TTx verhindert werden. Auch wenn die verwendete Konzentration in der Literatur als effektiv beschrieben wurde, werden in anderen Studien teilweise höhere Konzentrationen verwendet (300 nM - 3 µM; MANZINI, 1992; KESLER et al., 2002; ZHANG et al., 2004; OH et al., 2006; BLANCHARD et al., 2012). Ähnlich wie beim NK₁-Rezeptor-Antagonisten RP-67580 könnte durch die Verwendung von höheren Dosen durchaus ein Effekt beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte zwar gezeigt werden, dass tatsächlich neuronal exprimierte TRPA1-Rezeptoren für die beobachtete Bronchokonstriktion verantwortlich sind, der genaue Mechanismus konnte jedoch nicht geklärt werden. Die weiterführenden Untersuchungen auf Grundlage dieser Arbeit lassen jedoch auf eine Beteiligung von Neuropeptiden, insbesondere von NK₁-Rezeptoragonisten an der Bronchokonstriktion vermuten. Der Signalweg, über den die Bronchokonstriktion vermittelt wird, muss jedoch noch genauer untersucht werden. Dabei spielen neben NK₁-Rezeptoragonisten eventuell weitere Neuropeptide, wie CGRP, eine Rolle bei der TRPA1-vermittelten Bronchokonstriktion.

4.2.2 Untersuchung der Ätiologie der Bronchodilatation

Im Gegensatz zur Bronchokonstriktion ist die beobachtete Bronchodilatation sowohl von sensorischen Neuronen als auch von TRPA1-Kanälen unabhängig. Dies konnte durch Versuche mit Tracheen nach organotypischer Kultur sowie durch Versuche mit isolierten Tracheen aus TRPA1-Knockout-Mäusen gezeigt werden. Bei der Untersuchung der Ätiologie der Bronchodilatation wurde somit das Augenmerk auf andere periphere Mechanismen gelegt. Wie auch die Bronchokonstriktion wurde die beobachtete Bronchodilatation untersucht, indem dem Organbad verschiedene Antagonisten und Blocker hinzugefügt wurden. Dazu zählten Antagonisten und Kanalblocker unterschiedlicher Signalwege, wie ein COX-Inhibitor (Indomethacin), ein NK₁-Rezeptor-Antagonist (RP-67580), ein Kaliumkanalblocker (Iberiotoxin), ein β-Adrenorezeptorblocker (Propranolol) sowie ein NOS-Inhibitor (L-NNA). Auch die Bronchodilatation konnte mit keinem der verwendeten Blocker signifikant beeinflusst werden, weshalb die Ätiologie der Bronchodilatation unklar bleibt. Wie bereits bei der Bronchokonstriktion beschrieben, zeigte sowohl der Einsatz von Indomethacin als auch

der von RP-67580 keinen signifikanten Unterschied in der Bronchodilatation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die TRPA1-vermittelte Bronchodilatation bei ähnlichem Versuchsaufbau mittels Indomethacin vollständig aufgehoben werden kann (CHEAH et al., 2014), wobei beide Substanzen in der selben Konzentration wie in dieser Arbeit verwendet wurden. Das nicht-steriodale Antiphlogistikum Indomethacin ist in höheren Konzentrationen selbst ein TRPA1-Agonist (HU et al., 2010), weshalb eine Dosiserhöhung in diesem Fall nicht zielführend erscheint. CHEAH et al. (2014) vermuteten in ihrer Arbeit, dass eine Aktivierung der neuronalen TRPA1-Rezeptoren zur Freisetzung von SP und somit zur Aktivierung der epithelialen NK₁-Rezeptoren führt. Dadurch wird die COX aktiviert und PGE₂ freigesetzt (CHEAH et al., 2014). PGE₂ ist bekanntlich in der Lage, über spezifische E-Prostanoid (EP)-Rezeptoren eine Bronchodilatation herbeizuführen (MELILLO et al., 1994). Dieser Mechanismus konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachvollzogen werden. Vielmehr scheint die Aktivierung von neuronalen TRPA1-Rezeptoren, wie bereits weiter oben diskutiert, eine NK₁-Rezeptor-abhängige Bronchokonstriktion zu vermitteln.

Auch der Einsatz des β -adrenergen Rezeptor Blockers Propranolol zeigte keine Veränderung der bronchodilatatorischen Wirkung von CA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit vermochte Propranolol die bronchodilatatorische Wirkung von Ingweröl vollständig aufzuheben (MANGPRAYOOL et al., 2013). Agonisten des β -adrenergen Rezeptors zählen zu den ältesten bekannten Bronchodilatoren und werden in der chinesischen Medizin seit über 2000 Jahren zur kurzfristigen Behandlung der Bronchokonstriktion verwendet und im letzten Jahrhundert stetig weiterentwickelt. Dabei führt ein Anstieg des zyklischen Guanosin-3'5'-Monophosphat (cAMP) in der ASM zu einer Bronchodilatation. Jedoch dürfte dieser Signalweg bei der beobachteten CA-induzierten Bronchodilatation keine Rolle spielen.

Neben den β -adrenergen Rezeptoren spielen in der ASM auch Kaliumkanäle, wie zum Beispiel spannungsabhängige Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (BK_{Ca}) oder ATP-abhängige Kaliumkanäle eine Rolle in der Regulation des Muskeltonus der ASM. Mit Hilfe von Iberitoxin, einem selektiven Kaliumkanal-Blocker, wurde die Beteiligung dieses Signalweges an der CA-vermittelten Bronchodilatation untersucht. Dabei zeigten mit Iberitoxin behandelte Trachealstücke jedoch keine Veränderung in der CA-vermittelten Bronchodilatation, was gegen eine Beteiligung dieses Signalweges spricht. Obwohl die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von Iberitoxin in der Literatur mit 250 pM angegeben wird (GALVEZ et al., 1990), wird in einzelnen Studien eine weitaus höhere

Konzentrationen (10 nM) verwendet (DESHPANDE et al., 2010). Aus diesem Grund könnte die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 1 nM zu gering sein, um eine Beteiligung dieses Signalweges sicher zu detektieren. Eine Aktivierung der BK_{Ca} führt zu einer Hyperpolarisation, welche dem Kalziumeintritt durch spannungsabhängige Kalziumkanäle entgegenwirkt und so zur Relaxation der ASM führt. Dabei regulieren die BK_{Ca}-Kanäle sowohl die Antwort der ASM auf kontraktile Agonisten, welche das intrazelluläre Kalzium erhöhen, als auch auf relaxierende Agonisten, welche die cAMP-Konzentration erhöhen. So wird die Relaxation der ASM durch Agonisten der *Bitter Taste Receptors* (TAS2R), wie Denatonium oder Chloroquin, durch eine lokalisierte, intrazelluläre Ansammlung von Kalzium an der Zellmembran, welche die Öffnung von BK_{Ca}-Kanälen vermittelt, ausgelöst (DESHPANDE et al., 2010). Durch die Verwendung von Iberiotoxin als Blocker erscheint eine Beteiligung der TAS2R, welche ebenfalls eine Bronchodilatation auslösen können, eher unwahrscheinlich.

Da sich die bisher eingesetzten Blocker als ineffektiv erwiesen, sollte in weiterer Folge NO geblockt werden. Sowohl NO als auch Nitrate und NO-Spender führen *in vitro* zu einer Bronchodilatation beim Meerschweinchen und Menschen (WARD et al., 1995). NO ist ein hochreaktives Molekül, welches an der glatten Muskelzelle durch die Aktivierung der solublen Guanylatcyclase einen Anstieg der cGMP-Konzentration bewirkt und somit zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle führt (BARNES & BELVISI, 1993). Es wird aus der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin durch Enzym NO-Synthasen (NOS) gebildet. NO wird in einer Vielzahl von Zellen im Atmungstrakt, wie Epithelzellen, Entzündungszellen, Endothelzellen der Gefäße und in den atemwegsinnervierenden Neuronen, produziert (KOBZIK et al., 1993) und könnte als Mediator der beobachteten Bronchodilatation fungieren. Durch die sehr kurze Halbwertszeit von NO (1-5 Sekunden) erscheint es sinnvoll, die Synthese von NO durch Hemmung der NOS zu inhibieren. Durch die Versuche mit L-NNA, einem potenten Inhibitor der NOS (PFEIFFER et al., 1996), kann jedoch auch dieser Signalweg für die beobachtete Bronchodilatation als unwahrscheinlich angesehen werden.

Trotz der Untersuchung unterschiedlicher Signalwege konnte der Mechanismus, über den die Bronchodilatation vermittelt wird, nicht geklärt werden.

4.2.2.1 Beteiligung von TRPV3 an der Bronchodilatation

Einige in dieser Arbeit verwendeten Agonisten, nämlich CA, Carvacrol, Thymol und 2-APB, sind sowohl Agonisten von TRPA1-Kanälen (BANDELL et al., 2004; LEE et al., 2008) als auch Agonisten von TRPV3-Kanälen (CHUNG et al., 2004; MACPHERSON et al., 2006;

XU et al., 2006). TRPV3 wird hauptsächlich in Keratinozyten der Haut exprimiert, wurde aber auch in der Zunge und dem menschlichen Larynx nachgewiesen (MOQRICH et al., 2005; HAMAMOTO et al., 2009). Auch eine Expression von TRPV3 in den Spinalganglien wurde bereits gezeigt (NILIUS & BÍRÓ, 2013). Es wäre deshalb möglich, dass für die beobachtete Bronchodilatation TRPV3-Kanäle verantwortlich sind. Um dies zu untersuchen, wurde die Expression von TRPV3 in der Trachea und den atemwegsinnervierenden sensorischen Neuronen untersucht. Dabei konnte TRPV3-mRNA neben den Spinalganglien auch im Ggl. jugulare nodosum der Maus nachgewiesen werden. Des weiteren lässt die immunhistologische Untersuchung von Mäusetracheen auf eine Expression im Trachealepithel schließen, wobei der Nachweis mittels RT-PCR auf Einzelzellebene im Trachealgewebe (Epithelzellen, ASM) nicht gelungen ist. Des weiteren konnte in funktionellen Organbadversuchen mit Mäusetracheen, bei denen das Epithel entfernt wurde, kein Unterschied in der Reaktion auf CA beobachtet werden. Diese Beobachtung spricht gegen eine Beteiligung epithelialer TRPV3-Rezeptoren am bronchodilatatorischen Effekt von CA. Auch die Ergebnisse aus den Organbadversuchen mit TRPA1-Blockern sprechen gegen eine Beteiligung von TRPV3 am bronchodilatatorischen Effekt von CA, da Ruthenium Red ein unspezifischer TRP-Kanal-Blocker ist und neben TRPA1 auch TRPV3 effektiv hemmt. In der vorliegenden Arbeit führte die Verwendung von Ruthenium Red jedoch nicht zu einer verstärkten Bronchokonstriktion, was für eine Beteiligung der TRPV3-Kanäle am bronchodilatatorischen Effekt sprechen würde, sondern zu einer verstärkten Bronchodilatation. Zusätzlich konnte in Organbadversuchen mit Trachealstücken nach organotypischer Kultur eine verstärkte Bronchodilatation verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet werden, womit eine Beteiligung von neuronal exprimierten TRPV3-Rezeptoren an der bronchodilatatorischen Wirkung von CA unwahrscheinlich erscheint. Zusammen mit den Ergebnissen aus den RT-PCR-Versuchen ist eine Beteiligung von TRPV3 am beobachteten bronchodilatatorischen Effekt nicht sehr wahrscheinlich.

4.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von TRPA1-Rezeptoren in sensorischen C-Faser-Neuronen eine Bronchokonstriktion ohne Beteiligung zentraler Reflexe auslösen kann, die jedoch von einem stärkeren bronchodilatatorischen Effekt der TRPA1-Agonisten überlagert wird (Abbildung 4.1).

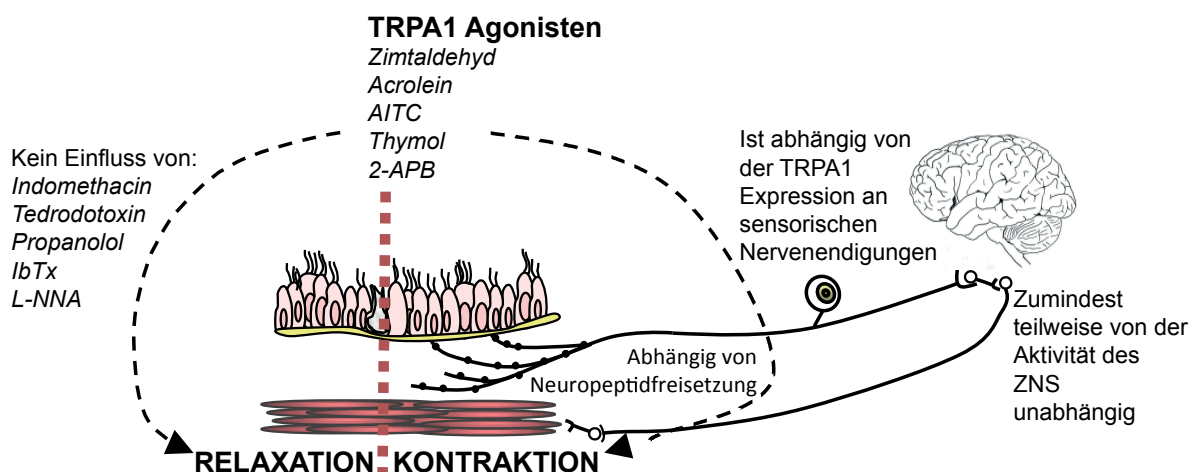


Abbildung 4.1: TRPA1-Agonisten sind für eine TRPA1-Rezeptor abhängige Bronchokonstriktion ohne Beteiligung zentraler Reflexe verantwortlich, welche durch eine Neuropeptidausschüttung vermittelt wird (rechte Seite der Abbildung). Gleichzeitig wird durch TRPA1-Agonisten eine weitaus stärkere TRPA1-unabhängige Bronchodilatation verursacht, deren Ätiologie in dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte. Ibero-toxin, IbTx; N^G-Nitro-L-Arginin, L-NNA; zentrales Nervensystem, ZNS; Allyl-Isothiocyanate, AITC; 2-Aminoethyldiphenylborate, 2-APB

Eine essentielle Bedeutung von TRPV1-Kanälen bzw. von TRPV1-exprimierenden C-Faser-Neuronen konnte bei der Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität gezeigt werden (TRÄNKNER et al., 2014). Des weiteren wurde nachgewiesen, dass eine lokale Freisetzung von Vesikelinhalten sensorischer Neurone dabei eine entscheidende Rolle spielt (TRÄNKNER et al., 2014). Eine andere Studie unterstreicht die wichtige Rolle der TRPA1-Rezeptoren bei der Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität, einem entscheidenden Charakteristikum des Asthmas bronchiale (CACERES et al., 2009). Dabei wurde gezeigt, dass bei TRPA1-defizienten Mäusen in einem Asthmamodell die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität beinahe vollständig inhibiert wird und die allergeninduzierte Leukozyteninfiltration der Atemwege deutlich abgeschwächt ist (CACERES et al., 2009). Schon seit längerem ist bekannt, dass TRPA1-Rezeptoren in der Lunge hauptsächlich in C-Faser-Neuronen, welche auch TRPV1 exprimieren, vorhanden sind (NASSENSTEIN et al., 2008). Die vorliegenden Arbeit bildet somit eine logische Verbindung von den Arbeiten von

TRÄNKNER et al. (2014) und CACERES et al. (2009), in denen gezeigt wurde, dass TRPA1-exprimierende C-Faser-Neurone eine Bronchokonstriktion durch die Aktivierung von TRPA1-Rezeptoren vermitteln, welche wahrscheinlich durch periphere Mechanismen mediiert wird. Dieser bronchokonstriktorische Effekt wird *in vitro* von einem bronchodilatatorischen TRPA1-Rezeptor unabhängigen Effekt der untersuchten TRPA1-Agonisten überlagert. Eine im Krankheitsfall eventuell veränderte Sensibilität des TRPA1-Rezeptors oder eine vermehrte Expression von TRPA1-Rezeptoren an sensorischen C-Faser-Neuronen könnte die Ursache am Krankheitsbild einiger Atemwegserkrankungen, wie zum Beispiel dem Asthma bronchiale, sein. TRPA1-Blocker könnten somit in Zukunft helfen, die für Asthmatiker unangenehmen Folgen der Atemwegshyperreagibilität, nämlich Allergen-unabhängige Asthmaanfälle, besser zu therapieren. Wäre bekannt, über welchen Mechanismus die TRPA1-unabhängige bronchodilatatorische Wirkung von TRPA1-Agonisten vermittelt wird, wäre dies gegebenenfalls ein neuer Therapieansatz neben der Gabe von TRPA1-Blockern.

5 Zusammenfassung

TRPA1 ist ein Ionenkanal, welcher hauptsächlich in sensorischen C-Faser-Neuronen exprimiert wird und von einem breiten Spektrum von Umweltirritantien und endogenen Entzündungsmediatoren geöffnet wird. Eine Aktivierung hat einen Kalziumanstieg zur Folge und löst einen zellulären Ioneneinstrom und somit Aktionspotentiale in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen *in vitro* sowie zentrale Reflexe *in vivo* aus. Unklar ist jedoch, ob die TRPA1-abhängige zentrale Reflextätigkeit Einfluss auf die Lungenfunktion hat. Vorangegangene *in vivo*-Versuche (Head-out-Bodyplethysmographie) ließen auf eine durch TRPA1-Agonisten induzierte Bronchodilatation schließen. Bislang wurde jedoch vermutet, dass TRPA1 eine Bronchokonstriktion verursacht und im Krankheitsfall sogar an der Entstehung von pulmonalen Erkrankungen, wie zum Beispiel Asthma, beteiligt ist. Durch Organbadversuche an explantierten, mit MCH vorkontrahierten Mäusetracheen konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass der bronchodilatatorische Effekt von CA, einem TRPA1-Agonisten, unabhängig von einer zentralen Reflexaktivität ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass weitere elektrophile und nicht-elektrophile TRPA1-Agonisten, wie Acrolein, AITC, 2-APB, Thymol und Carvacrol, den selben dosisabhängigen bronchodilatatorischen Effekt aufweisen. Um zu prüfen, ob dieser Effekt tatsächlich TRPA1 abhängig ist, wurden TRPA1-Antagonisten, wie HC-030031, AP-18 und Ruthenium Red, vor der Stimulation mit TRPA1-Agonisten hinzugefügt oder Tracheen aus TRPA1-Knockout-Mäusen verwendet. Interessanter Weise war der bronchodilatatorische Effekt von CA unter Anwesenheit von TRPA1-Blockern sowie bei den Tracheen aus TRPA1-Knockout-Mäusen signifikant erhöht, was auf eine TRPA1-medierte bronchokonstriktorische Wirkung von CA, die von einer TRPA1-unabhängigen Bronchodilatation überlagert wird, schließen lässt. Mit Hilfe der organotypischen Kultur der Tracheen vor dem Organbadversuch wurde untersucht, ob die TRPA1-abhängige Bronchokonstriktion abhängig von sensorischen Neuronen ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Degeneration tatsächlich mit einer erhöhten Bronchodilatation einhergeht und die bronchokonstriktorische Wirkung von in sensorischen Neuronen exprimierten TRPA1-Kanälen vermittelt wird. Die Ergebnisse aus weiterführenden Versuchen bestätigen, dass die Bronchokonstriktion durch Neuropeptide und ihrer Rezeptoren vermittelt wird, wohingegen die Blockade anderer Rezeptoren keine Wirkung zeigte. Zusammenfassend wurde in der Arbeit gezeigt, dass die Aktivierung von TRPA1-Kanälen in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen eine Bronchokonstriktion bewirkt, welche durch einen bronchodilatatorischen Effekt unbekannter Ätiologie überlagert wird.

6 Summary

TRPA1 is a cation channel of the transient receptor potential channel family that is predominantly expressed in sensory C-fibers and can be activated by a wide variety of environmental irritants and endogenous inflammatory mediators relevant for asthma. Activation increases $[Ca^{2+}]_i$, induces inward currents and action potential discharge in lung-innervating C-fibers *in vitro* and elicits central reflexes *in vivo*. However, it remained unclear if TRPA1-dependent central reflex activity is associated with changes in lung function. Head-out-bodyplethysmography experiments surprisingly showed a bronchodilatory effect of the TRPA1-agonist cinnamaldehyde (CA). Until now, it was suspected that activation of TRPA1 results in bronchoconstriction and is involved in pulmonary diseases such as asthma. Organ bath experiments on explanted, methacholine-precontracted tracheal rings revealed that the CA effect was independent from central reflexes, but could be mimicked by a variety of electrophilic and non-electrophilic TRPA1 agonists, including arachidonic acid, AITC, 2-APB, thymol and carvacrol. To test whether the observed effects were TRPA1-mediated, different TRPA1-antagonists (HC-030031, AP-18, Ruthenium-Red) were applied before stimulation with TRPA1 agonists, or, alternatively, tracheal rings from TRPA1-knockout mice were used. Surprisingly, the bronchodilatory effect of CA was significantly increased by pre-treatment with TRPA1-antagonists as well as in tissue of TRPA1-knockout mice, indicating that CA causes a TRPA1-mediated bronchoconstriction which is superimposed by a TRPA1-independent bronchodilation. Both effects were further investigated. To test if the TRPA1-dependent bronchoconstriction involves sensory neurons, an organotypic culture was performed. Our results indicate that degeneration of sensory neurons was indeed associated with an increased bronchodilation. Further investigations prove the involvement of neuropeptides and their receptors in bronchoconstriction, whereas other blockers were ineffective. We conclude that activation of TRPA1 in C-fibers induces a neuropeptide-mediated bronchoconstriction superimposed by a bronchodilatory effect of unknown etiology.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.2:.....	22
Abbildung 2.3:.....	23
Abbildung 2.4:.....	24
Abbildung 2.5:.....	24
Abbildung 2.6:.....	25
Abbildung 2.7:.....	33
Abbildung 3.1:.....	41
Abbildung 3.2:.....	42
Abbildung 3.3:.....	43
Abbildung 3.4:.....	45
Abbildung 3.5:.....	47
Abbildung 3.6:.....	48
Abbildung 3.7:.....	50
Abbildung 3.8:.....	51
Abbildung 3.9:.....	53
Abbildung 3.10:.....	54
Abbildung 3.11:.....	55
Abbildung 3.12:.....	56
Abbildung 3.13:.....	58
Abbildung 3.14:.....	60
Abbildung 3.15:.....	61
Abbildung 3.16:.....	62
Abbildung 3.17:.....	62
Abbildung 3.18:.....	63
Abbildung 3.19:.....	64
Abbildung 3.20:.....	65
Abbildung 3.21:.....	65
Abbildung 3.22:.....	66
Abbildung 3.23:.....	67
Abbildung 3.24:.....	68
Abbildung 3.25:.....	68
Abbildung 3.26:.....	69

Abbildung 3.27:.....	70
Abbildung 3.28:.....	71
Abbildung 3.29:.....	72
Abbildung 3.30:.....	73
Abbildung 3.31:.....	74
Abbildung 4.1:.....	84

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pharmaka für das retrograde Markieren der sensorischen, atemwegsinnervierenden Neurone	18
Tabelle 2: In den Organbadversuchen verwendete Reagenzien und Medien	21
Tabelle 3: Für die Immunhistochemie verwendete Reagenzien.	27
Tabelle 4: Für das Kalziumimaging verwendete Reagenzien.	30
Tabelle 5: Für die PCR verwendete Reagenzien.	35
Tabelle 6: Herstellung der DNA-Leiter	36
Tabelle 7: Für die PCR verwendete Primer. Alle verwendeten Primer waren Intron spannend.	39
Tabelle 8: Zusammensetzung des Mastermix (* = im HotStarTaq Master Mix Kit enthalten)40	
Tabelle 9: Ablauf Polymerase-Kettenreaktion	40
Tabelle 10: Dosisabhängige bronchodilatatorische Wirkung ausgehend von der maximalen MCH-induzierten Bronchokonstriktion unterschiedlicher elektrophiler (Acrolein; Allylisothiocyanat, AITC; Zimtaldehyd, CA) und nicht-elektrophiler (Thymol; Carvacrol; 2-Aminoethyldiphenylborate, 2-APB) TRPA1-Agonisten. (Mittelwert \pm SEM)	46

9 Literaturverzeichnis

- AGOSTONI, B.Y.E., CHINNOCK, J.E., DALY, M.D.E.B. & MURRAY, J.G., (1957): Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat. *Journal of Physiology*, **135**, 182–205.
- ALVAREZ, D.F., KING, J. a, WEBER, D., ADDISON, E., LIEDTKE, W. & TOWNSLEY, M.I., (2006): Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. *Circulation Research*, **99**, 988–995.
- ANDRÈ, E., CAMPI, B., MATERAZZI, S., TREVISANI, M., AMADESI, S., MASSI, D., CREMINON, C., VAKSMAN, N., NASSINI, R., CIVELLI, M., BARALDI, P., POOLE, D., BUNNETT, N., GEPPETTI, P. & PATACCHINI, R., (2008): Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by α,β -unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, **118**, 2574–82.
- ANDRÈ, E., GATTI, R., TREVISANI, M., PRETI, D., BARALDI, P.G., PATACCHINI, R. & GEPPETTI, P., (2009): Transient receptor potential ankyrin receptor 1 is a novel target for pro-tussive agents. *British Journal of Pharmacology*, **158**, 1621–1628.
- BAKER, C. V & BRONNER-FRASER, M., (2001): Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Developmental Biology*, **232**, 1–61.
- BALUK, P., NADEL, J.A. & MCDONALD, D.M., (1992): Substance P-immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: A quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation. *Journal of Comparative Neurology*, **319**, 586–598.
- BANDELL, M., STORY, G., HWANG, S. & VISWANATH, V., (2004): Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, **41**, 849–857.
- BARALDI, P.G., PRETI, D., MATERAZZI, S. & GEPPETTI, P., (2010): Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**, 5085–107.
- BARNES, P.J. & BELVISI, M.G., (1993): Nitric oxide and lung disease. *Thorax*, **48**, 1034–1043.
- BAUTISTA, D.M., JORDT, S.-E., NIKAI, T., TSURUDA, P.R., READ, A.J., POBLETE, J.,

-
- YAMOAH, E.N., BASBAUM, A.I. & JULIUS, D., (2006): TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, **124**, 1269–82.
- BEIROWSKI, B., ADALBERT, R., WAGNER, D., GRUMME, D.S., ADDICKS, K., RIBCHESTER, R.R. & COLEMAN, M.P., (2005): The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wld S) nerves. *BMC Neuroscience*, **27**, 1–27.
- BESSAC, B. & SIVULA, M., (2008): TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *Journal of Clinical Investigation*, **118**, 1899–1910.
- BIRRELL, M. a, BELVISI, M.G., GRACE, M., SADOFSKY, L., FARUQI, S., HELE, D.J., MAHER, S. a, FREUND-MICHEL, V. & MORICE, A.H., (2009): TRPA1 agonists evoke coughing in guinea pig and human volunteers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **180**, 1042–7.
- BLANCHARD, M.G., RASH, L.D. & KELLENBERGER, S., (2012): Inhibition of voltage-gated Na⁺ currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *British Journal of Pharmacology*, **165**, 2167–2177.
- BONO, M. De, TOBIN, D. & DAVIS, M., (2002): Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature*, **419**, 899–903.
- CACERES, A.I., BRACKMANN, M., ELIA, M.D., BESSAC, B.F., CAMINO, D. DEL, D'AMOURS, M., WITEK, J.S., FANGER, C.M., CHONG, J.A., HAYWARD, N.J., HOMER, R.J., COHN, L., HUANG, X., MORAN, M.M. & JORDT, S.-E., (2009): A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 9099–9104.
- CANNING, B.J., (2006): Anatomy and neurophysiology of the cough reflex ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **33**–47.
- CARR, M.J. & UNDEM, B.J., (2003): Bronchopulmonary afferent nerves. *Respirology*, **8**, 291–301.
- CHEAH, E.Y., BURCHAM, P.C., MANN, T.S. & HENRY, P.J., (2014): Acrolein relaxes mouse isolated tracheal smooth muscle via a TRPA1-dependent mechanism. *Biochemical Pharmacology*, **89**, 148–56.

- CHUNG, M.-K., LEE, H., MIZUNO, A., SUZUKI, M. & CATERINA, M.J., (2004): 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *Journal of Neuroscience*, **24**, 5177–82.
- CLAPHAM, D.E., (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature*, **426**, 517–524.
- COCKCROFT, D. & DAVIS, B., (2009): Direct and indirect challenges in the clinical assessment of asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **103**, 363–370.
- COLERIDGE, H. & COLERIDGE, J., (1977): Impulse activity in afferent vagal C-fibres with endings in the intrapulmonary airways of dogs. *Respiration Physiology*, **29**, 125–142.
- COLERIDGE, H. & COLERIDGE, J., (1994): Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense. *Annual Review of Physiology*, **56**, 69–91.
- D'AMICO-MARTEL, A. & NODEN, D.M., (1983): Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *American Journal of Anatomy*, **166**, 445–468.
- DEFALCO, J., STEIGER, D., GUSTAFSON, A., EMERLING, D.E., KELLY, M.G. & DUNCTON, M. a J., (2010): Oxime derivatives related to AP18: agonists and antagonists of the TRPA1 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 276–9.
- DESHPANDE, D.A., WANG, W.C.H., MCILMOYLE, E.L., ROBINETT, K.S., SCHILLINGER, R.M., AN, S.S., SHAM, J.S.K. & LIGGETT, S.B., (2010): Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nature Medicine*, **16**, 1299–1304.
- DEVILLIER, P., ACKER, G., ADVENIER, C., MARSAC, J., REGOLI, D. & FROSSARD, N., (1992): Activation of an epithelial neurokinin NK-1 receptor induces relaxation of rat trachea through release of prostaglandin E2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **263**, 767–772.
- DOIHARA, H., NOZAWA, K., KOJIMA, R., KAWABATA-SHODA, E., YOKOYAMA, T. & ITO, H., (2009): QGP-1 cells release 5-HT via TRPA1 activation: a model of human enterochromaffin cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **331**, 239–245.
- DRAKE, M.G., SCOTT, G.D., PROSKOCIL, B.J., FRYER, A.D., JACOBY, D.B. & KAUFMAN, E.H., (2013): Toll-like receptor 7 rapidly relaxes human airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **188**, 664–72.

-
- DUPUY, P., SHORE, S., DRAZEN, J.M., FROSTELL, C., HILL, A. & ZAPOL, W., (1992): Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *Journal of Clinical Investigation*, **90**, 421–428.
- EARLEY, S., (2009): Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by transient receptor potential and Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **57**, 148–153.
- EID, S.R., CROWN, E.D., MOORE, E.L., LIANG, H. a, CHOONG, K.-C., DIMA, S., HENZE, D. a, KANE, S. a & URBAN, M.O., (2008): HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Molecular Pain*, **4**, 48.
- EILERS, H., CATTARUZZA, F., NASSINI, R., MATERAZZI, S., ANDRE, E., CHU, C., COTTRELL, G., SCHUMACHER, M., GEPPETTI, P. & BUNNETT, N., (2010): Pungent general anesthetics activate transient receptor potential-A1 to produce hyperalgesia and neurogenic bronchoconstriction. *Anesthesiology*, **112**, 1452–1463.
- EVANS, H.E. & LAHUNTA, A. DE, (2013): The respiratory system. In H. E. Evans & A. de Lahunta, editors *Miller's Anatomy of the dog*. Elsevier, pp. 338–359.
- FORSBERG, K. & KARLSSON, J., (1986): Cough induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons in conscious guinea-pigs. *Acta Physiologica Scandinavica*, **128**, 319–320.
- FUJIMURA, M., SAKAMOTO, S., KAMIO, Y. & MATSUDA, T., (1992): Effects of methacholine induced bronchoconstriction and procaterol induced bronchodilation on cough receptor sensitivity to inhaled capsaicin and tartaric acid. *Thorax*, **46**, 441–445.
- FULLER, R., DIXON, C. & BARNES, P., (1985): Bronchoconstrictor response to inhaled capsaicin in humans. *Journal of Applied Physiology*, **58**, 1080–1084.
- GALVEZ, A., GIMENEZ-GALLEGU, G., REUBEN, J.P., ROY-CONTANCIN, L., FEIGENBAUM, P., KACZOROWSKI, G.J. & GARCIA, M.L., (1990): Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *buthus tamulus*. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 11083–11090.
- GEPPETTI, P., NASSINI, R., MATERAZZI, S. & BENEMEI, S., (2008): The concept of neurogenic inflammation. *BJU International*, **101**, 2–6.

- GRACE, M.S., BAXTER, M., DUBUIS, E., BIRRELL, M. a & BELVISI, M.G., (2014): Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *British Journal of Pharmacology*, **171**, 2593–607.
- HAMAMOTO, T., TAKUMIDA, M., HIRAKAWA, K., TATSUKAWA, T. & ISHIBASHI, T., (2009): Localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV) in the human larynx. *Acta Otolaryngologica*, **129**, 560–568.
- HINMAN, A., CHUANG, H.-H., BAUTISTA, D.M. & JULIUS, D., (2006): TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 19564–8.
- HO, C.-Y., GU, Q., LIN, Y.. & LEE, L.-Y., (2001): Sensitivity of vagal afferent endings to chemical irritants in the rat lung. *Respiration Physiology*, **127**, 113–124.
- HU, H., TIAN, J., ZHU, Y., WANG, C., XIAO, R., JEFFREY, M., WOOD, J.D. & ZHU, M.X., (2010): Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, **459**, 579–592.
- HUNTER, D.D. & UNDEM, B.J., (1999): Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **159**, 1943–1948.
- HWANG, J., KIM, M., KIM, S. & LEE, J., (2013): Quantifying morphological parameters of the terminal branching units in a mouse Lung by phase contrast synchrotron radiation computed tomography. *PLoS ONE*, **8**, .
- IBARRA, Y. & BLAIR, N.T., (2013): Benzoquinone reveals a cysteine-dependent desensitization mechanism of TRPA1. *Molecular Pharmacology*, **83**, 1120–32.
- JANG, Y., LEE, Y., KIM, S., YANG, Y., JUNG, J. & OH, U., (2012): Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Archives of Pharmacal Research*, **35**, 1823–30.
- JAUQUEMAR, D., SCHENKER, T. & TRUEB, B., (1999): An Ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 7325–7333.
- JONZON, A., PISARRI, T., COLERIDGE, J. & COLERIDGE, H., (1985): Rapidly adapting receptor activity in dogs is inversely related to lung compliance. *Journal of Applied Physiology*, **61**, 1980–1987.
- JOOS, G., PAUWELS, R. & STRAETEN, M. Van Der, (1987): Effect of inhaled substance P

- and neurokinin A on the airways of normal and asthmatic subjects. *Thorax*, **80**, 779–783.
- JORDT, S., BAUTISTA, D. & CHUANG, H., (2004): Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, **427**, 260–265.
- KALIA, M. & MESULAM, M., (1980): Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *Journal of Comparative Neurology*, **193**, 435–465.
- KARASHIMA, Y., TALAVERA, K., EVERAERTS, W., JANSSENS, A., KWAN, K.Y., VENNEKENS, R., NILIUS, B. & VOETS, T., (2009): TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 1273–8.
- KASKE, S., KRASTEVA, G., KÖNIG, P., KUMMER, W., HOFMANN, T., GUDERMANN, T. & CHUBANOV, V., (2007): TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neuroscience*, **8**, 49.
- KENNEDY, a N.N.R., DESROSIERS, A. & LITTLE, J.B., (1978): Morphometric and histological analysis of the lungs of Syrian golden hamsters. *Journal of Anatomy*, **125**, 527–553.
- KESLER, B.S., MAZZONE, S.B. & CANNING, B.J., (2002): Nitric Oxide – dependent modulation of smooth-muscle tone by airway parasympathetic nerves. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **165**, 481–488.
- KINDT, K.S., VISWANATH, V., MACPHERSON, L., QUAIST, K., HU, H., PATAPOUTIAN, A. & SCHAFER, W.R., (2007): *Caenorhabditis elegans* TRPA-1 functions in mechanosensation. *Nature Neuroscience*, **10**, 568–77.
- KOBZIK, L., BREDET, D., LOWENSTEIN, C., DRAZEN, J., GASTON, B., SUGARBAKER, D. & STAMLER, J., (1993): Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **9**, 371–377.
- KOLLARIK, M., DINH, Q.T., FISCHER, A. & UNDEM, B.J., (2003): Capsaicin-sensitive and -insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. *The Journal of Physiology*, **551**, 869–79.
- KÖNIG, H. & LIEBICH, H., (2005): Atmungsapparat. In H. König & H. Liebich, editors

Anatomie der Haussäugetiere. Stuttgart: Schattauer, pp. 367–388.

- KRASTEVA, G., CANNING, B.J., HARTMANN, P., VERES, T.Z., PAPADAKIS, T., MÜHLFELD, C., SCHLIECKER, K., TALLINI, Y.N., BRAUN, A., HACKSTEIN, H., BAAL, N., WEIHE, E., SCHÜTZ, B., KOTLIKOFF, M., IBANEZ-TALLON, I. & KUMMER, W., (2011): Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 9478–9483.
- KUMMER, W., FISCHER, A., KURKOWSKI, R. & HEYM, C., (1992): The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience*, **49**, 715–737.
- KWAN, K.Y., ALLCHORNE, A.J., VOLLRATH, M. a, CHRISTENSEN, A.P., ZHANG, D.-S., WOOLF, C.J. & COREY, D.P., (2006): TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, **50**, 277–89.
- KWAN, K.Y., GLAZER, J.M., COREY, D.P., RICE, F.L. & STUCKY, C.L., (2009): TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, **29**, 4808–19.
- LEE, L.Y. & PISARRI, T.E., (2001): Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respiration Physiology*, **125**, 47–65.
- LEE, S.P., BUBER, M.T., YANG, Q., CERNE, R., CORTÉS, R.Y., SPROUS, D.G. & BRYANT, R.W., (2008): Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *British Journal of Pharmacology*, **153**, 1739–49.
- LIAO, M., CAO, E., JULIUS, D. & CHENG, Y., (2013): Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo- microscopy. *Nature*, **504**, 107–112.
- MACPHERSON, L., DUBIN, A., EVANS, M., MARR, F., SCHULTZ, P., CRAVATT, B. & PATAPOUTIAN, A., (2007): Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*, **445**, 541–5.
- MACPHERSON, L., XIAO, B., KWAN, K., PETRUS, M., DUBIN, A., HWANG, S., CRAVATT, B., COREY, D. & PATAPOUTIAN, A., (2007): An ion channel essential for sensing chemical damage. *Journal of Neuroscience*, **27**, 11412–5.
- MACPHERSON, L.J., GEIERSTANGER, B.H., VISWANATH, V., BANDELL, M., EID, S.R., HWANG, S. & PATAPOUTIAN, A., (2005): The pungency of garlic: activation of

-
- TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Current Biology*, **15**, 929–34.
- MACPHERSON, L.J., HWANG, S.W., MIYAMOTO, T., DUBIN, A.E., PATAPOUTIAN, A. & STORY, G.M., (2006): More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Molecular and Cellular Neurosciences*, **32**, 335–43.
- MANGPRAYOOL, T., KUPITTAYANANT, S. & CHUDAPONGSE, N., (2013): Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. *Fitoterapia*, **89**, 68–73.
- MANZINI, S., (1992): Bronchodilatation by tachykinins and capsaicin in the mouse main bronchus. *British Journal of Pharmacology*, **105**, 968–972.
- MATTA, J. a, CORNETT, P.M., MIYARES, R.L., ABE, K., SAHIBZADA, N. & AHERN, G.P., (2008): General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 8784–9.
- MAZZONE, S.B., REYNOLDS, S.M., MORI, N., KOLLARIK, M., FARMER, D.G., MYERS, A.C. & CANNING, B.J., (2009): Selective expression of a sodium pump isozyme by cough receptors and evidence for its essential role in regulating cough. *Journal of Neuroscience*, **29**, 13662–71.
- MCNAMARA, C.R., MANDEL-BREHM, J., BAUTISTA, D.M., SIEMENS, J., DERANIAN, K.L., ZHAO, M., HAYWARD, N.J., CHONG, J. a, JULIUS, D., MORAN, M.M. & FANGER, C.M., (2007): TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 13525–30.
- MELILLO, E., WOOLLEY, K.L., MANNING, P.J., WATSON, R.M. & O'BYRNE, P.M., (1994): Effect of inhaled PGE2 on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **149**, 1138–1141.
- MONTELL, C. & RUBIN, G., (1989): Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, **2**, 1313–1323.
- MOQRICH, A., HWANG, S.W., EARLEY, T.J., PETRUS, M.J., MURRAY, A.N., SPENCER, K.S.R., ANDAHAZY, M., STORY, G.M. & PATAPOUTIAN, A., (2005): Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the

- skin. *Science*, **307**, 1468–1472.
- MUKHOPADHYAY, I., GOMES, P., ARANAKE, S., SHETTY, M., KARNIK, P., DAMLE, M., KURUGANTI, S., THORA, S. & KHAIRATKAR-JOSHI, N., (2011): Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, **31**, 350–358.
- MUROI, Y., RU, F., CHOU, Y.-L., CARR, M.J., UNDEM, B.J. & CANNING, B.J., (2013): Selective inhibition of vagal afferent nerve pathways regulating cough using Nav 1.7 shRNA silencing in guinea pig nodose ganglia. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **304**, R1017–23.
- NAGATA, K., DUGGAN, A., KUMAR, G. & GARCÍA-AÑOVEROS, J., (2005): Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *Journal of Neuroscience*, **25**, 4052–61.
- NASSENSTEIN, C., KWONG, K., TAYLOR-CLARK, T., KOLLARIK, M., MACGLASHAN, D.M., BRAUN, A. & UNDEM, B.J., (2008): Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *Journal of Physiology*, **586**, 1595–604.
- NASSENSTEIN, C., TAYLOR-CLARK, T.E., MYERS, A.C., RU, F., NANDIGAMA, R., BETTNER, W. & UNDEM, B.J., (2010): Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs. *Journal of Physiology*, **588**, 4769–83.
- NILIUS, B. & BÍRÓ, T., (2013): TRPV3: a ‘more than skinny’ channel. *Experimental Dermatology*, **22**, 447–52.
- NOZAWA, K., KAWABATA-SHODA, E., DOIHARA, H., KOJIMA, R., OKADA, H., MOCHIZUKI, S., SANO, Y., INAMURA, K., MATSUSHIME, H., KOIZUMI, T., YOKOYAMA, T. & ITO, H., (2009): TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 3408–13.
- OH, E.J., MAZZONE, S.B., CANNING, B.J. & WEINREICH, D., (2006): Reflex regulation of airway sympathetic nerves in guinea-pigs. *Journal of Physiology*, **573**, 549–64.
- OHTA, T., IMAGAWA, T. & ITO, S., (2007): Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1)

- channels. *Biochemical Pharmacology*, **73**, 1646–1656.
- PACK, A. & DELANEY, R., (1983): Response of pulmonary rapidly adapting receptors during lung inflation. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, **55**, 955–963.
- PACK, R., AL-UGAILY, L., MORRIS, G. & WIDDICOMBE, J., (1980): The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell and Tissue Research*, **208**, 65–84.
- PAVELKA, M., RONGE, H. & STOCKINGER, G., (1976): Vergleichende Untersuchungen am Trachealepithel verschiedener Säuger. *Acta Anatomica*, **94**, 262–282.
- PETERLIN, Z., CHESLER, A. & FIRESTEIN, S., (2007): A painful trp can be a bonding experience. *Neuron*, **53**, 635–638.
- PETRUS, M., PEIER, A.M., BANDELL, M., HWANG, S.W., HUYNH, T., OLNEY, N., JEGLA, T. & PATAPOUTIAN, A., (2007): A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Molecular Pain*, **3**, 40.
- PFEIFFER, S., LEOPOLD, E., SCHMIDT, K., BRUNNER, F. & MAYER, B., (1996): Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *British Journal of Pharmacology*, **118**, 1433–1440.
- PRETI, D., SZALLASI, A. & PATAACCHINI, R., (2012): TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **22**, 663–695.
- PUIZILLOUT, J. & GAMBARELLI, F., (1989): Electrophysiological and morphological properties of type C vagal neurons in the nodose ganglion of the cat. *Journal of Autonomic Nervous System*, **29**, 49–58.
- RAEMDONCK, K., ALBA, J. DE, BIRRELL, M. a., GRACE, M., MAHER, S. a., IRVIN, C.G., FOZARD, J.R., O'BYRNE, P.M. & BELVISI, M.G., (2012): A role for sensory nerves in the late asthmatic response. *Thorax*, **67**, 19–25.
- RICCIARDOLO, F., (2003): Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, **58**, 175–182.
- RICCIO, M.M., KUMMER, W., BIGLARI, B., MYERS, A.C. & UNDEM, B.J., (1996): Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig

- airways. *Journal of Physiology*, **496**, 521–530.
- SAWADA, Y., HOSOKAWA, H., MATSUMURA, K. & KOBAYASHI, S., (2008): Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *European Journal of Neuroscience*, **27**, 1131–42.
- SCHELEGLE, E.S. & GREEN, J.F., (2001): An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. *Respiration Physiology*, **125**, 17–31.
- SPRINGALL, D., CADIEUX, A., OLIVEIRA, H., H, S., ROYSTON, D. & POLAK, J., (1987): Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *Journal of Autonomic Nervous System*, **20**, 155–166.
- STOKES, A., WAKANO, C., KOBLAN-HUBERSON, M., ADRA, C.N., FLEIG, A. & TURNER, H., (2006): TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cellular Signalling*, **18**, 1584–1594.
- STORY, G., PEIER, A., REEVE, A., EID, S., MOSBACHER, J., HRICIK, T., EARLEY, T., HERGARDEN, A., ANDERSSON, D., HWANG, S., MCINTYRE, P., JEGLA, T., BEVAN, S. & PATAPOUTIAN, A., (2003): ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, **112**, 819–829.
- STOWERS, L., HOLY, T., MEISTER, M., DULAC, C. & KOENTGES, G., (2002): Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, **295**, 1493–1500.
- STRAUS, D. & GLASS, C., (2001): Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Medical Research Reviews*, **21**, 185–210.
- STRENG, T., AXELSSON, H., HEDLUND, P., ANDERSSON, D., JORDT, S., BEVAN, S., ANDERSSON, K., HÖGESTÄTT, E. & ZYGMUNT, P., (2008): Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *European Urology*, **53**, 391–399.
- SUAREZ, C.J., DINTZIS, S. & FREVERT, C., (2011): Respiratory System. In P. Treuting & S. Dintzis, editors *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Oxford, UK: Academic Press, pp. 121–133.
- TALAVERA, K., GEES, M., KARASHIMA, Y., MESEGUER, V.M., VANOIRBEEK, J. a J., DAMANN, N., EVERAERTS, W., BENOIT, M., JANSSENS, A., VENNEKENS,

-
- R., VIANA, F., NEMERY, B., NILIUS, B. & VOETS, T., (2009): Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nature Neuroscience*, **12**, 1293–9.
- TAYLOR-CLARK, T. & UNDEM, B., (2008): Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Molecular ...*, **112**, 819–829.
- TAYLOR-CLARK, T.E., MCALEXANDER, M. a, NASSENSTEIN, C., SHEARDOWN, S. a, WILSON, S., THORNTON, J., CARR, M.J. & UNDEM, B.J., (2008): Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal. *Journal of Physiology*, **586**, 3447–59.
- TRÄNKNER, D., HAHNE, N., SUGINO, K., HOON, M. a & ZUKER, C., (2014): Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 11515–20.
- TREVISANI, M., SIEMENS, J., MATERAZZI, S., BAUTISTA, D., NASSINI, R., CAMPI, B., IMAMACHI, N., ANDRÈ, E., PATACCHINI, R., COTTRELL, G., GATTI, R., BASBAUM, A., BUNNETT, N., JULIUS, D. & GEPPETTI, P., (2007): 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 13519–13524.
- UNDEM, B.J., CHUAYCHOO, B., LEE, M.-G., WEINREICH, D., MYERS, A.C. & KOLLARIK, M., (2004): Subtypes of vagal afferent C-fibres in guinea-pig lungs. *Journal of Physiology*, **556**, 905–917.
- UNDEM, B.J. & TAYLOR-CLARK, T., (2014): Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **133**, 1521–1534.
- WARD, J.K., BARNES, P.J., TADJKARIMI, S., YACOU, M.H. & BELVISI, M.G., (1995): Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in humal trachea. *Journal of Physiology*, **483** (Pt 2, 525–536.
- WATANABE, N., HORIE, S., MICHAEL, G.J., KEIR, S., SPINA, D., PAGE, C.P. & PRIESTLEY, J. V., (2006): Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. *Neuroscience*, **141**, 1533–1543.

- WIDDICOMBE, J., (2001): Airway receptors. *Respiration Physiology*, **125**, 3–15.
- WIDDICOMBE, J., (2003): Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology, **270**, 2–10.
- WIDDICOMBE, J., (1954): Receptors in the trachea and bronchi of the cat. *Journal of Physiology*, **123**, 71–104.
- XU, H., BLAIR, N.T. & CLAPHAM, D.E., (2005): Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *Journal of Neuroscience*, **25**, 8924–37.
- XU, H., DELLING, M., JUN, J.C. & CLAPHAM, D.E., (2006): Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neuroscience*, **9**, 628–35.
- YU, J., (2000): Spectrum of myelinated pulmonary afferents. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **40292**, 2142–2148.
- ZHANG, L., JONES, S., BRODY, K., COSTA, M. & BROOKES, S.J.H., (2004): Thermosensitive transient receptor potential channels in vagal afferent neurons of the mouse. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **286**, G983–91.
- ZHANG, Y., HOON, M., CHANDRASHEKAR, J., MUELLER, K., COOK, B., WU, D., ZUKER, C. & RYBA, N., (2003): Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, **112**, 293–301.
- ZHOU, X.-L., BATIZA, A.F., LOUKIN, S.H., PALMER, C.P., KUNG, C. & SAIMI, Y., (2003): The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7105–10.
- ZHOU, Y., SUZUKI, Y., UCHIDA, K. & TOMINAGA, M., (2013): Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. *Nature Communications*, **4**, .
- ZHUO, H., ICHIKAWA, H. & HELKE, C.J., (1997): Neurochemistry of the nodose ganglion. *Progress in Neurobiology*, **52**, 79–107.

10 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen

Georg Haider, Jae-Hwa Lee, Silke Wiegand, Emma Spies, Heinz-Gerd Hoymann, Veronika Grau, Wolfgang Kummer, Armin Braun, Christina Nassenstein (2015) TRPA1-Agonists: Novel bronchodilators? Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL) Annual Meeting Hamburg

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein größter Dank geht an Frau Prof. Veronika Grau, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer und Frau Dr. Christina Nassenstein für die Überlassung des Themas und die herausragende Betreuung dieser Arbeit. Ganz besonders danke ich Frau Dr. Christina Nassenstein für die umfangreiche Unterstützung und ihr unermüdliches Engagement, das freundschaftliche Verhältnis sowie die aufmunternden oder mahnenden Worte zur jeweils rechten Zeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener danke ich für die Übernahme der Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin.

Für die hervorragende Einarbeitung möchte ich mich bei Tamara Papadakis und Martin Bodenbenner bedanken. Besonderer Dank gilt Silke Wiegand, die bei kleinen und großen Problemen immer ein offenes Ohr für mich hatte. Allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie danke ich für die nette Zusammenarbeit und die schöne Zeit.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und meiner Liebe Maximiliane danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist.

